

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis antigénicos de extractos cárnicos solubles,  
procedentes de diversas especies animales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María del Carmen Casas Valencia**

DIRECTORES:

**José Tormo Iguacel**  
**Bernabé Sanz Pérez**

Madrid, 2015

TP  
1983  
217

María del Carmen Casas Valencia



X-53-102522-6

ANÁLISIS ANTIGENICOS DE EXTRACTOS CARNICOS SOLUBLES,  
PROCEDENTES DE DIVERSAS ESPECIES ANIMALES

Departamento de Higiene, Inspección y Microbiología de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

217/83

© M<sup>a</sup> del Carmen Casas Valencia  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1983  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-33948-1983

MA CARMEN CASAS VALENCIA

"ANALISIS ANTIGENICO DE EXTRACTOS CARNICOS  
SOLUBLES PROCEDENTES DE DIVERSAS ESPECIES  
ANIMALES"

Bernabé Sanz Pérez  
Catedrático de Bromatología  
y Microbiología de los Alimentos.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Veterinaria  
Departamento de Higiene y  
Microbiología de los Alimentos.

Año 1.982



BERNABE SANZ PEREZ, Catedrático de Bromatología y Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICO:**

Que la tesis titulada "ANALISIS ANTIGENICO DE EXTRACTOS CARNICOS SOLUBLES PROCEDENTES DE DIVERSAS ESPECIES ANIMALES" ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Prof. Adjunto Dr. D. José Tormo Iguacel y del supraescrito, cumpliendo las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, tres de Febrero de mil novecientos ochenta y dos.



A mis padres

»





### AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Bernabé Sanz Pérez, Catedrático de Bromatología y Microbiología de los Alimentos y, al Prof. Dr. D. José Tormo Iguacel, Adjunto de la citada Cátedra por la dirección conjunta de esta tesis doctoral, así como por las orientaciones y enseñanzas recibidas a lo largo de su planteamiento y ejecución.

Mi gratitud especial al Prof. Dr. D. Pascual López Lorenzo por su constante estímulo y asesoramiento en los aspectos bibliográficos.

Mi recuerdo cariñoso a todos los miembros del Departamento de Higiene, Inspección y Microbiología de los Alimentos, por su amistad y compañerismo, que tanto han facilitado mi labor.

Finalmente, deseo dar las gracias al personal facultativo y auxiliar del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Central "Gómez Ulla", por su colaboración en el proceso de inmunización de los lotes de conejos.

## II

### INDICE

	Pág.
CAPITULO I .- INTRODUCCION .....	1
CAPITULO II .- REVISION BIBLIOGRAFICA .....	6
II.A.- SEPARACION DE PROTEINAS EN FUNCION DE SU TA- MAÑO MOLECULAR .....	6
II.B.- SEPARACION DE PROTEINAS EN FUNCION DE SU SO- LUBILIDAD .....	9
II.C.- SEPARACION DE PROTEINAS EN FUNCION DE SU CAR- GA ELECTRICA .....	12
II.D.- SEPARACION DE PROTEINAS BASADA EN LA ESPECI- FICIDAD DE LIGANDOS .....	18
II.E.- SEPARACION DE PROTEINAS POR METODOS INMUNO- LOGICOS .....	20
1.- RADIOINMUNOENSAYO.....	20
2.- MICROFIJACION DEL COMPLEMENTO.....	22
3.- AGLUTINACION DE PARTICULAS INERTES .....	24
4.- REACCION DE PRECIPITACION .....	25
5.- INMUNODIFUSION EN AGAROSA .....	27
6.- INMUNODIFUSION RADIAL .....	30
7.- INMUNOELECTROFORESIS .....	32
8.- HEMAGLUTINACION PASIVA .....	37
CAPITULO III.- OBJETO DEL TRABAJO .....	41
CAPITULO IV.- MATERIAL Y METODOS .....	
IV.A.- EXTRACTOS ANTIGENICOS .....	45
1.- Preparación .....	45
2.- Técnicas auxiliares .....	47
a.- Método de Biuret .....	47

### III

	Pág.
IV.B.- OBTENCION DE INMUNOSUEROS .....	49
1.- Pauta de inmunización .....	49
2.- Sangría final .....	52
3.- Obtención y conservación del suero ....	53
IV.C.- PRUEBA DE PRECIPITACION EN TUBO CAPILAR ...	54
IV.D.- METODOS DE INMUNODIFUSION .....	55
1.- Inmunodifusión en gel .....	55
a.- Preparación del gel de agarosa ....	55
b.- Preparación de las placas.....	56
c.- Llenado de las excavaciones con los extractos antigénicos y el inmuno- suero .....	57
d.- Período de incubación .....	57
e.- Lavado y secado .....	58
f.- Tinción .....	58
g.- Lectura .....	59
2.- Inmunodifusión radial .....	62
a.- Técnica .....	62
b.- Lectura .....	63
IV.E.- ELECTROFORESIS SIMPLE EN GEL DE POLIACRILA- MIDA .....	64
1.- Preparación de los geles .....	64
2.- Preparación de la muestra .....	65
3.- Disposición de los geles y de la muestra	65
4.- Período electroforético .....	66
5.- Tinción y conservación .....	67
IV.F.- INMUNOELECTROFORESIS EN AGAROSA .....	69
1.- Electroforesis simple en agarosa .....	69
a.- Preparación de las placas .....	69

#### IV

	Pág.
b.- Disposición de los extractos anti- génicos.....	70
c.- Período electroforético.....	72
2.- Inmunodifusión en agarosa .....	72
a.- Técnica .....	72
b.- Cálculo de las movilidades electro- foréticas .....	73
IV.G.- CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE LAS FRAC- CIONES DEL INMUNOELECTROFEROGRAMA.....	75
1.- Tinción de glicoproteínas .....	77
a.- Reactivos .....	77
b.- Técnica .....	77
2.- Tinción de lipoproteínas .....	78
a.- Reactivos .....	78
b.- Técnica .....	78
IV.H.- HEMAGLUTINACION PASIVA .....	79
1.- Reactivos .....	79
2.- Lavado de hematíes .....	79
3.- Tanización .....	80
4.- Sensibilización .....	81
5.- Reacción .....	81
6.- Lectura .....	81
7.- Controles .....	82
CAPITULO V.- RESULTADOS Y DISCUSION	
V.A. TITULOS DE PRECIPITINAS ALCANZADOS EN EL PRO- CESO DE HIPERINMUNIZACION, EFECTUADO EN CONE- JOS, POR INOCULACION PARENTERAL DE LOS DIVER- SOS EXTRACTOS ANTIGENICOS.....	83

V

	Pág.
V.R.- ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS EN GEL DE POLI- ACRILAMIDA CORRESPONDIENTES A LOS DIVERSOS EXTRACTOS ANTIGENICOS .....	87
V.C.- COMPOSICION ANTIGENICA DE DIVERSOS EXTRAC- TOS SOLUBLES DE PROTEINAS MUSCULARES, FRENTE A INMUNOSUEROS HOMOLOGOS Y HETERO- LOGOS, POR INMUNODIFUSION EN GEL DE AGA- ROSA, SEGUN OUCHTERLONY .....	100
1.- Sistemas homólogos .....	100
a.- Determinación de la concentración óptima de los extractos antigéni- cos a utilizar en las pruebas.....	100
b.- Número de fracciones diferenciadas.	103
2.- Sistemas heterólogos .....	106
a.- Determinación de la concentración óptima de los extractos antigéni- cos a utilizar en las pruebas.....	106
b.- Número de fracciones diferenciadas.	111
V.D.- EXTRACTOS SOLUBLES DE PROTEINAS MUSCULARES FRENTE A INMUNOSUEROS HOMOLOGOS Y HETERO - LOGOS, POR INMUNODIFUSION RADIAL EN AGARO- SA, SEGUN MANCINI .....	126
1.- Sistemas homólogos .....	126
a.- Determinación de la concentración óptima de los extractos antigéni- cos y de los inmunosueros a utili- zar en las pruebas.....	126
b.- Areas de los halos de precipitación	132

	VI	
		Pág.
2.- Sistemas heterólogos.....		138
a.- Determinación de la concentración óptima de los extractos antigénicos y de los inmunosueros a utilizar en las pruebas .....		138
b.- Areas de los halos de precipitación..		139
V.E.- COMPOSICION ANTIGENICA DE DIVERSOS EXTRACTOS DE PROTEINAS SOLUBLES MUSCULARES, FRENTE A INMUNOSUEROS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS, POR INMUNOELECTROFORESIS EN AGAROSA, SEGUN SCHEIDEGGER.....		146
1.- Sistemas homólogos.....		146
a.- Determinación de la concentración óptima de los extractos antigénicos a utilizar en las pruebas.....		146
b.- Número de fracciones diferenciadas y movilidades electroforéticas .....		147
2.- Sistemas heterólogos.....		167
a.- Determinación de la concentración óptima de los extractos antigénicos a utilizar en las pruebas .....		167
b.- Número de fracciones diferenciadas y movilidades electroforéticas .....		168
V.F.- EXTRACTOS SOLUBLES DE PROTEINAS MUSCULARES FRENTE A INMUNOSUEROS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS POR HEMAGLUTINACION PASIVA, SEGUN LEWIS Y KESSEL.....		179
1.- Tanización y sensibilización.....		181

# VII

	Pág.
2.- Sistemas homólogos.....	186
3.- Sistemas heterólogos.....	186
CAPITULO VI.- CONCLUSIONES.....	201
CAPITULO VII.- BIBLIOGRAFIA.....	204





## INTRODUCCION



## CAPITULO I.

### INTRODUCCION.

Los primeros trabajos que demostraron diferencias detectables, mediante métodos bioquímicos, entre las distintas especies animales datan de hace unos treinta y cinco años (Deutsch y Goodloe, 1.945; Moore, 1.945). Se efectuaron con electroforesis séricas y, aunque no permitieron establecer nuevas concepciones relacionadas con la taxonomía o clasificación de las especies, sí fueron trascendentes desde el punto de vista de la Genética y de la propia Bioquímica.

Durante las décadas siguientes, se publicaron excelentes estudios, como la determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas o de las propiedades físico-químicas de las macromoléculas y su relación con las rutas metabólicas, que han motivado que, las investigaciones de este tipo, sean realizadas más por bioquímicos, biofísicos, fisiólogos y microbiólogos que por taxonomistas. No obstante, la electroforesis, la cromatografía y algunas técnicas inmunológicas que se pueden poner a punto fácilmente, han sido las que han alcanzado mayor desarrollo para resolver estos problemas de diferenciación de proteínas y, consecuentemente, de especies animales.

La evolución morfológica y funcional son el resultado de modificaciones que implican, en última instancia, un fenómeno de selección. Ambas, dependen de

la estructura química, que a su vez, está controlada por la genética. Una alteración del código genético origina cambios en la composición química e induce a la síntesis de un nuevo componente estructural o funcional.

Las proteínas se encuentran sometidas a cambios graduales de este tipo. Se han descubierto diferencias entre proteínas homólogas, de individuos de una misma especie, que aunque pueden ser mínimas desde el punto de vista químico, llegan a ser importantes funcionalmente.

En 1.909, Reichert y Brown, publicaron sus conocidos estudios cristalográficos, en relación con las hemoglobinas de más de 100 especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Pero el significado de estos resultados no fué realmente valorado hasta bastante más tarde, cuando se asociaron con el concepto de que las proteínas se componen de largas cadenas de aminoácidos unidos por enlaces covalentes y que pueden tener carácter específico. Existen al menos, una docena de hemoglobinas humanas diferentes, la mayoría de las cuales difieren, únicamente, en un sólo aminoácido incluido en una cadena compuesta de cerca de 300. Así, si se sustituye el ácido glutámico de la hemoglobina A, por valina, se obtiene la hemoglobina S que es insoluble cuando se reduce y da lugar a una alteración de los glóbulos rojos, que adquieren forma de media luna. Se trata de una enfermedad hereditaria que recibe el nombre de anemia falciforme.

La insulina, también se encuentra sometida a cambios evolutivos en las distintas especies animales

(Harris y col., 1.956). Las diferencias pueden afectar a sólo uno, dos o tres aminoácidos y no originan modificaciones funcionales o patológicas, aunque sí afectan a la conformación superficial de las moléculas y, por lo tanto, a su diferenciación por métodos inmunológicos.

Las relaciones entre especies animales se fundamentan en la estructura química de ciertas sustancias como la albúmina u otras proteínas (Sarich, 1.969) y, pueden detectarse serológicamente a través de reacciones cruzadas. Las diferencias de orden químico o de orden inmunológico se correlacionan, en muchos casos, con las correspondientes al diverso grado evolutivo de las especies animales.

La utilización de la prueba de precipitación, en el estudio de las relaciones entre animales, es tan antigua como la propia reacción. Los primeros investigadores utilizaban cantidades constantes de antisueros frente a diluciones variables de antígeno, pues ya se conocía empíricamente que, el exceso de antígeno podía dar lugar a un fenómeno de inhibición de la precipitación.

Nuttall, (1.904) estudió las relaciones antigénicas de las proteínas plasmáticas de mamíferos, aves y reptiles. Cada antisuero, daba un mayor porcentaje de positividad cuando se enfrentaba con antígenos derivados de la misma especie o de otras del mismo orden. Así, el antisuero de buey era positivo frente al 72% de los antígenos procedentes de ungulados y, el de canguro reaccionaba con el 65% de los antígenos de marsupiales. Las aves constituían un grupo distinto, que no mostraban re-

laciones con las demás especies ensayadas. Resultaba significativo que los reptiles presentaran reacción cruzada con las aves, ya que, presumiblemente, éstas proceden de aquéllos.

Se han encontrado numerosas e interesantes reacciones cruzadas al utilizar la prueba de precipitación entre especies animales ancestrales (Friedenthal, 1.905; Boyden y Noble, 1.933).

Boyden (1.942), demuestra que el mulo, posee proteínas séricas inmunológicamente análogas a las de las especies progenitoras.

Williams (1.964), aporta conclusiones importantes sobre las relaciones antigénicas entre primates, utilizando procedimientos cuantitativos para evaluar las analogías serológicas existentes entre varios grupos. Las reacciones de albúminas y globulinas séricas frente al inmuosuero anti-albúmina y anti-gammaglobulina humanas se determinaban por análisis de las curvas de precipitación y mediante pruebas de difusión en gel. Los resultados se expresaban como porcentajes, en relación con los que se hubieran obtenido con antígenos humanos..

Mez y Ziegenspeck en 1.926, resumieron el trabajo efectuado para conseguir el denominado "árbol genealógico o serológico" de las especies (Gatner, 1.929). Las reacciones cruzadas detectadas estaban correlacionadas anatómica, morfológica, citológica y paleontológicamente y sirvieron de base para otras muchas investigaciones posteriores.

Nosotros intentaremos, una vez conocidas las analogías y diferencias básicas de las proteínas, llegar a estudiar, mediante métodos inmunológicos, los extractos antigénicos solubles de las proteínas cárnicas del ganado vacuno, caballo, cerdo, perro y pollo, con el fin de poderlas identificar, caracterizar las fracciones específicas y comprobar la eficacia de los diversos métodos inmunológicos (inmunodifusión, inmunoelectroforesis y hemaglutinación pasiva) en la diferenciación de carnes de estas especies.



5. 178

REVISION BIBLIOGRAFICA

## CAPITULO II.

### REVISION BIBLIOGRAFICA.

La separación, purificación y caracterización de las proteínas se ha venido realizando desde hace mucho tiempo por métodos fisicoquímicos que, en la mayor parte de los casos, han servido para conseguir su aislamiento y purificación, gracias a su excepcional poder de resolución.

En este sentido, consideramos de mayor interés revisar las técnicas más utilizadas con el fin de estudiar sus principios fundamentales, aplicaciones e, incluso, sus ventajas e inconvenientes.

Las proteínas son macromoléculas de peso molecular definido, que forman verdaderas disoluciones moleculares, cuyo comportamiento se rige por los mismos principios físicos que los electrolitos pequeños.

Las diferencias de las características de las proteínas en disolución pueden aprovecharse a la hora de efectuar su separación, que puede llevarse a cabo por técnicas basadas en el tamaño molecular, en la solubilidad, en la carga eléctrica, en la especificidad de ligandos y en sus propiedades inmunológicas.

#### II.A. SEPARACION DE PROTEINAS EN FUNCION DE SU TAMAÑO MOLECULAR.

Las proteínas globulares en disolución

pueden separarse fácilmente de los solutos de bajo peso molecular por diálisis (Craig y King, 1.957).

La base de la técnica radica en el hecho de que las membranas semipermeables retienen las moléculas de proteína permitiendo que pasen las de soluto y agua más pequeñas que aquéllas. Para aumentar el rendimiento de las técnicas de diálisis se emplean aparatos de flujo continuo, con el fin de reducir el tiempo de separación de las sustancias.

La ultrafiltración constituye otro sistema para separar las proteínas de pequeño tamaño. Se ha utilizado sobre todo, para concentrar proteínas y polisacáridos, aprovechando la aplicación de una presión positiva por encima de la membrana semipermeable o haciendo el vacío por debajo de la misma, facilitando de esta forma, el paso de las moléculas de agua y sales disueltas.

Los estudios iniciales de Svedberg y col., (1.940) sobre centrifugación, sentaron las bases de las actuales técnicas de centrifugación en gradiente de densidad (Andersen, 1.968). La técnica se utiliza más como método de determinación del peso molecular que para la purificación de proteínas. Las proteínas en disolución, tienen tendencia a sedimentar en campos centrífugos elevados, superando así, la fuerza opuesta representada por la difusión. Al someter la mezcla de proteínas, que se coloca en la parte superior del gradiente a la acción de la fuerza centrífuga, las proteínas emigran hacia el fondo del tubo, hasta encontrar una densidad de sacarosa igual a su propia densidad. De esta forma, las moléculas de proteína forman bandas, de acuerdo con su peso, densidad y forma (Roizman y col.,

1.958). Estas bandas pueden detectarse ópticamente o, una vez congelado el contenido del tubo, dividirse por planos para su análisis final.

La cromatografía de filtración por gel es una variedad que tiene su fundamento en que, cuando una mezcla de proteínas, disuelta en una solución tampón apropiada, se deja fluir a través de una columna rellena de un material inerte, de elevado grado de hidratación, los diferentes compuestos protéicos van descendiendo, atravesando la columna, a velocidades distintas (Latte y Ruthven, 1.956).

Entre los materiales inertes que se emplean para el llenado de la columna, citaremos:

- El "Sephadex", que se utiliza sobre todo, para separaciones de compuestos hidrófobos, tales como, proteínas y carbohidratos.
- Polímeros, con diferentes grados de porosidad, preparados por polimerización de acrilamida, en presencia de concentraciones variables de bisacrilamida (Gelotte, 1.960).

La distribución de un soluto particular, para un determinado tipo de gel, está definida por el llamado "coeficiente de distribución", que viene dado en función del peso molecular. Si el soluto se compone de moléculas de gran tamaño, éstas no pueden penetrar en las partículas del material inerte y, en consecuencia, son excluidas, atravesando más rápidamente la columna. El coeficiente de distribución será cero. Por el contrario, si el soluto posee moléculas suficientemente pequeñas, éstas tienen completa accesibilidad al material inerte y son retenidas. El coeficiente de distribución será uno. La variación de este coeficiente entre los límites cero y uno, es la que hace posible la sepa-

ración de proteínas dentro de unos límites, en relación al peso molecular y para un gel determinado.

Esta técnica se denomina también "cromatografía de exclusión molecular", ya que no se produce una verdadera filtración pues, únicamente, las grandes partículas son las que atraviesan la columna.

## II.B. SEPARACION DE PROTEINAS EN FUNCION DE SU SOLUBILIDAD.

La solubilidad de una proteína está determinada por tres factores principales:

- Densidad y distribución de la carga.
- Grado de hidratación.
- Presencia de componentes no protéicos como fosfatos, carbohidratos o lípidos.

Las proteínas presentan cambios profundos de su solubilidad al variar factores como el pH, las propiedades dieléctricas del solvente, la fuerza iónica y la temperatura. Entre las técnicas de separación, basadas en estas diferencias de solubilidad, analizaremos brevemente la precipitación isoelectrica, la producida por adición de sales, el fraccionamiento con disolventes y los sistemas con temperatura variable.

Los aislamientos de la seroalbúmina, de las gammaglobulinas séricas y del fibrinógeno se consiguieron utilizando técnicas basadas en el diverso grado de solubilidad de las proteínas (Cohn y Edsall, 1.941).

Cada aminoácido o proteína presenta propiedades anfóteras según su grupo terminal y cadena lateral. La

propiedad de actuar como ácido o base es la responsable de la capacidad tampón de las proteínas. Un aminoácido cuyo pH sea ácido a su punto isoeléctrico, tendrá carga positiva, mientras que, ésta será negativa, a pH básico. El pH, al que una proteína muestra un mínimo de solubilidad es su pH isoeléctrico, definido como aquel valor de pH al que la molécula no posee carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico.

Ya que en una mezcla de proteínas cada una de ellas posee un valor de pH isoeléctrico diferente, puesto que, en cada caso, también es distinto el contenido de aminoácidos con grupos ionizables, es posible separar unas proteínas de otras, por precipitación isoeléctrica. Así, al ajustar el pH de una solución protéica al pH isoeléctrico de una fracción determinada, precipitará la mayor parte de esa fracción, mientras que permanecen en disolución, los componentes cuyos valores de pH isoeléctrico se encuentren por encima o por debajo del que ha precipitado. Finalmente, la proteína separada, al conservar su conformación nativa puede redisolverse en un medio cuya concentración salina y pH sean adecuados.

Antes de utilizarse los métodos electroforéticos, los análisis químicos de las proteínas se realizaban de acuerdo con las técnicas de precipitación salina de Hower, (1.921), o con las modificadas por Reinhold, (1.953).

Las sales neutras a baja concentración, aumentan el grado de solubilidad de las proteínas, fenómeno que recibe el nombre de "solubilización por salado". Las sales de iones divalentes son más eficaces en cuanto

a su capacidad de solubilización, que las de iones monovalentes. Por otro lado, la capacidad de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas es función de su fuerza iónica. Al aumentar ésta, la solubilidad de la proteína comienza a disminuir, de tal modo que puede terminar por precipitar. Este fenómeno se ha llamado "insolubilización por salado". La sal hidratada absorbe las moléculas de agua con lo que se deshidratan las proteínas y disminuye su solubilidad (Henry, 1.964). Para precipitar proteínas y extractos antigénicos se emplea sobre todo el sulfato amónico, ya que permite la redisolución final de la proteína sin que ésta sufra un proceso de desnaturalización.

El fraccionamiento con disolventes se ha utilizado para la preparación de ciertos extractos anti-génicos (Oliver-Gonzalez, 1.946; Kagan y col., 1.958).

La adición de determinados disolventes, como el etanol y la acetona, disminuye la solubilidad de las proteínas en agua y termina por producir su precipitación.

La fuerza de atracción entre dos moléculas es directamente proporcional al producto de las cargas positivas y negativas e, inversamente proporcional, a la constante dieléctrica del medio y al cuadrado de la distancia que separa dichas moléculas. Por consiguiente, al añadir, a una solución acuosa de proteínas, disolventes que poseen una constante dieléctrica menor que la del agua, se produce un incremento de la atracción de las cargas opuestas y una disminución del grado de ionización, por lo que las moléculas de proteína precipitan. Resulta esen-

cial controlar el pH y la cantidad de iones inorgánicos presentes. Este tratamiento debe efectuarse a temperaturas muy bajas con el fin de evitar la desnaturalización de las proteínas.

Los procedimientos de fraccionamiento de proteínas, en general, o de extractos antigénicos, en particular, se efectúan casi siempre a temperaturas de refrigeración próximas a 0°C., ya que así aumenta la estabilidad de las mismas. No obstante, algunas proteínas presentan estabilidad y solubilidad máximas a temperatura ambiente. Los sistemas de modificación de la solubilidad en función de la temperatura se han empleado para la separación de proteínas. La mayor parte de ellas, aumentan su solubilidad al incrementar su temperatura, dentro de ciertos límites (en general de 0 a 40°C.).

## II.C. SEPARACION DE PROTEINAS EN FUNCION DE SU CARGA ELECTRICA.

Otro método fundamentado en el comportamiento ácido-básico de las proteínas, como base para su separación, es el denominado "cromatografía de intercambio iónico". Estas técnicas cromatográficas se efectúan con resinas intercambiadoras de iones y están basadas en los trabajos de Thompson y Way (cf. Kunin, 1,958).

El mecanismo de intercambio se desarrolla en cinco etapas:



- a) Difusión del ión a intercambiar hasta la superficie de la resina.
- b) Difusión del ión, procedente de la mezcla protéica a analizar, a través de la resina hasta el lugar de intercambio.
- c) Intercambio de iones en los lugares apropiados.
- d) Difusión del ión intercambiado, a través de la resina, hasta la superficie.
- e) Difusión del ión intercambiado en la solución.

La concentración de proteína en el eluido, que se recoge en fracciones pequeñas, se valora ópticamente por su capacidad de absorber la luz en la región del ultravioleta. Las posibilidades separadoras de esta técnica se aumentan cambiando el pH de la solución tampón, a lo largo del fraccionamiento de la proteína.

Las resinas intercambiadoras son polímeros sintéticos, altamente insolubles, que pueden considerarse como ácidos o bases polifuncionales. Fundamentalmente se usan dos tipos de resinas de intercambio catiónico, la DOWEX-50 y la AMBERLITA IRC-50. Entre las resinas de intercambio aniónico, citaremos las preparadas por modificación química de la celulosa: la carboximetil (CM)-celulosa y la dietilaminoetil (DEAE)-celulosa, que fueron introducidas en 1.956 por Peterson y Sober.

Cuando una solución, que contiene una sal amínica, se coloca en una columna que contiene resinas de intercambio catiónico en la forma ácida, la resina tomará el catión amino de la solución y lo reemplazará con un catión hidrógeno. Una resina de intercambio catiónico, en

la forma sódica, reemplazará iones como el calcio y el magnesio de la solución, con la liberación de iones sodio. Por otra parte, una resina de intercambio aniónico, saturada con iones cloruro, reemplazará los iones inorgánicos débiles de la solución, por el ión cloruro.

La resina de intercambio aniónico DEAE-celulosa se ha utilizado, entre otras muchas aplicaciones, en el fraccionamiento de proteínas sarcoplásmicas de músculo esquelético de vacuno (Fujimaki y Deatherase, 1.964; Ramp-ton y col., 1.965) y en el estudio de sus alteraciones por tratamiento con temperaturas altas (Thomson y col., 1.968).

Los resultados de la técnica de electroforesis constituyen uno de los criterios más importantes para estudiar la homogeneidad de las proteínas, así como para la caracterización de éstas y de numerosos carbohidratos.

La electroforesis consiste, básicamente, en la migración de las partículas cargadas dentro de un campo eléctrico. La velocidad de desplazamiento depende del tamaño y de la carga de las partículas, de la viscosidad del medio, del voltaje del campo y de otros factores. La carga está influenciada por el pH y la concentración de electrolitos en el medio que actúa como soporte. Experimentalmente, se determina mediante el control de la velocidad de migración, siempre que se mantengan constantes los demás factores.

A pH por debajo del punto isoeléctrico, la proteína posee carga neta positiva y, en consecuencia, emigra al electrodo negativo.

La duración de la electroforesis depende,

Fundamentalmente, del voltaje y de la fuerza iónica de la solución tampón. Al efectuar la prueba a temperatura constante (generalmente entre 105 y 120°C.), las proteínas se coagulan y pueden teñirse fácilmente con azul de bromofenol, negro amida, azocarmín o cualquier otro colorante, que tenga afinidad por las proteínas. La intensidad de las manchas, de las diversas fracciones o zonas, se miden, colorimétricamente, con un densitómetro.

La utilización de los geles de acrilamida y almidón ha permitido la separación de proteínas a partir de mezclas muy complejas, como han señalado Whipple (1.964), Morris (1.964) y Porter (1.966).

Se ha estudiado comparativamente el tamaño de los poros, en geles de acrilamida y almidón, de diferente composición y concentración. La capacidad de atravesar el medio gelificado depende, no sólo de la dimensión y forma de los poros, sino también, del tamaño de las moléculas y de las interacciones (como fenómenos de adsorción o de intercambio iónico) que pueden establecerse entre las moléculas y la matriz del gel.

La solución de almidón que se utiliza para electroforesis es de consistencia viscosa, debido a que las cadenas de carbohidratos se ramifican y entrecruzan, hasta formar un gel semirrígido.

El gel de almidón contiene una pequeña proporción de grupos carboxilo que, a pH neutro, se cargan negativamente. Como consecuencia disminuye la electroendósmosis y aumenta la separación entre las fracciones (Pert y Pinteric, 1.964; Gartzner y Beaven, 1.961).

En el caso de la acrilamida, el gel está formado por cadenas largas en las que, la mayor o menor proporción de enlaces, depende de la adición de bisacrilamida antes de su polimerización. Estas sustancias deben manipularse con cuidado y precaución ya que son de carácter tóxico (Fullerton y Barnes, 1.966).

Los trabajos de Fawcett y Morris, (1.966), se ocupan de los efectos relacionados con la disminución de la capacidad de atravesar estos medios, por parte de las sustancias sometidas a electroforesis, cuando se varía la proporción de bisacrilamida en la concentración final de acrilamida.

Al comparar las bandas de proteínas de los geles de almidón y acrilamida se observa claramente que las fracciones correspondientes a las proteínas de mayor peso molecular dan lugar a bandas más nítidas y diferenciadas en acrilamida que en almidón.

Los medios gelificados deben ser insolubles para evitar posibles contaminaciones de las proteínas separadas.

Se ha comprobado que el grado de insolubilidad de la acrilamida disminuye al conservar durante algún tiempo el gel previamente preparado (Gordon y Louis, 1.967).

La flexibilidad y resistencia al corte del medio preparado con acrilamida permite una fácil manipulación del gel sin que se produzcan fracturas, durante las operaciones de tinción y lectura densitométrica. Estos

materiales de acrilamida también tienen la ventaja de una buena adherencia a la superficie de vidrio.

Al no presentar grupos reactivos, los medios gelificados con acrilamida se pueden teñir por muchos métodos e incluso es fácil efectuar coloraciones de caracterización (glicoproteínas y lipoproteínas, fundamentalmente).

La separación electroforética se ha empleado para la determinación del peso molecular (Dunker y Rueckert, 1.969; Shapiro y col., 1.967), para diferenciar mezclas complejas de antígenos protéicos en geles de poliacrilamida, tanto en presencia de dodecil sulfato sódico, que descompone las proteínas a cadenas polipeptídicas sencillas (Converse y Papermaster, 1.975; Wabb y col., 1.977; Chua y Bolmberg, 1.979), como en su ausencia (Loft, 1.975; Lundahl y Liljas, 1.975; Ekwall y col., 1.976). Así mismo, tiene aplicación en la identificación de mioglobinas de mamíferos marinos y terrestres (Höyen y Thorson, 1.970), en la diferenciación de proteínas de peces, con fines taxonómicos (Hill y col., 1.966; Thompson, 1.960 1.961; Mackie, 1.968; Chu, 1.968; Manusco, 1.964) y, finalmente, mediante la técnica de Poulik (1.957), para la identificación y caracterización de las proteínas sarcoplásmicas del músculo porcino normal y exudativo; existen otros muchos ejemplos que sería prolijo enumerar.

Entre los inconvenientes achacados a esta técnica, citaremos la dificultad que presenta la identificación de las fracciones electroforéticas, como consecuencia de las diferencias que pueden observarse en las modificaciones a la técnica original, apuntadas por los

diversos investigadores (Nerberg, 1.972). En ciertos casos, puede ser importante la evaporación que sufre la solución tamponada. Esta pérdida de agua determina la concentración de sales y la formación de un campo, no uniforme, al paso de la corriente continua, con incremento de la evaporación y de la conversión de la energía eléctrica en calórica (Leggett, 1.962). El calentamiento que se produce es desfavorable especialmente para la electroforesis de enzimas, que exige una técnica especial.

#### II.D. SEPARACION DE PROTEINAS BASADA EN LA ESPECIFICIDAD DE LIGANDOS.

Algunas proteínas integradas en mezclas complejas, pueden aislarse por su capacidad de unión específica, no covalente, con otra molécula llamada "ligando". Esta afinidad la presentan ciertos enzimas para su coenzima específico, determinados anticuerpos en relación con sus antígenos homólogos, así como cualquier sistema cuyas interacciones reversibles reflejan un elevado grado de especificidad biológica (Cutrecasas y Anfinsen, 1.971).

Esta técnica, denominada "cromatografía de afinidad", se basa en las experiencias iniciales de Campbell y col., (1.951), que empleaban celulosa como matriz insoluble. Actualmente se pueden utilizar, como soportes sólidos, diferentes tipos de materiales: poliestireno, poliacrilamida, vidrio poroso, agarosa o un derivado del dextrano denominado "sephadex".

Una matriz insoluble, ideal para cromatografía de afinidad, debe poseer las siguientes caracte-

rísticas:

- a) Tener abundantes grupos químicos capaces de establecer la unión con el "ligando".
- b) Ser estable durante su unión con la macromolécula y su subsiguiente elución.
- c) Debe reaccionar débilmente con otras macromoléculas, con el fin de minimizar la absorción no específica.
- d) Tener buenas propiedades de flujo.

El principio básico consiste en la inmovilización de uno de los componentes del sistema en un soporte poroso insoluble, que es capaz de absorber selectivamente, aquel componente del medio líquido con el que pueda reaccionar. El pH y fuerza iónica de la solución tampón deben ser los óptimos para la interacción "ligando" macromolécula. La elución se puede lograr por alguno de los diversos procedimientos, que tienen por resultado la disociación del complejo.

La técnica puede utilizarse para aislar sustancias específicas, anticuerpos, enzimas, hormonas, inhibidores y proteínas portadoras en base a sus interacciones bioespecíficas con proteínas inmovilizadas.

Cuando, como en nuestro caso, se trabaja con extractos protéicos muy similares, por proceder de los mismos tejidos de diversas especies animales, puede comprobarse que los inconvenientes de las técnicas analíticas, de base química, superan a sus ventajas.

En este sentido, consideramos previamente y, tuvimos ocasión de comprobar posteriormente la superioridad de los métodos inmunológicos, especialmente

cuando se combinan con pruebas de caracterización inmunoquímica.

## II.E. SEPARACION DE PROTEINAS POR METODOS INMUNOLOGICOS.

### II.E.1. RADIOINMUNOENSAYO.

Las técnicas de radioinmunoensayo se basan en la competencia a establecer entre una concentración conocida de antígeno o proteína radioactiva y otra desconocida del mismo antígeno no marcado, en la mezcla problema para unirse a una concentración conocida de anticuerpo (Yalow y Berson, 1.960). Estos sistemas tienen aplicación en el análisis de hormonas (Collins y Hennem, 1.976), de enzimas (Roberts y Painter, 1.977) y de proteínas (Bolton y Hunter; 1.973). Rangel, (1.966), utiliza esta técnica para el estudio de las reacciones cruzadas entre seroalbúmina equina y bovina.

Las técnicas para proteínas o enzimas son extraordinariamente sensibles. El marcado de las proteínas con iodo puede modificar su estructura molecular y, en consecuencia, afectar a la correcta reactividad de la prueba (Krohm y col., 1.977). La utilización de métodos de marcaje con iodo, puede dar lugar a modificaciones antigénicas pequeñas, ya que las proteínas se marcan sobre todo a nivel de la tirosina (Krohm y col., 1.977). El tratamiento de las proteínas con iodo puede, en determinadas circunstancias, modificar sus propiedades antigénicas, detectables especialmente por técnicas de inmunoadsorción (Mayer y Walker, 1.980).



Para marcar estos antígenos o proteínas se emplea comúnmente el  $I^{125}$  y el  $I^{131}$ .

Uno de los aspectos más importantes de la aplicación de la técnica a proteínas radica en la necesidad de contar con un sistema adecuado para separar el antígeno proteico libre de los complejos antígeno-anticuerpo. Con esta finalidad se han empleado separaciones por electroforesis, cromatografía de intercambio iónico, filtración por gel, solubilización por salado y precipitación por adición de sales.

Una vez preparados estos reactivos, la primera operación consiste en incubar cantidades conocidas de antisuero, antígeno o proteína marcada y antígeno no marcado. Este último compete con el marcado respecto a los puntos de unión con el anticuerpo. La segunda operación consiste en separar el antígeno ligado al anticuerpo del antígeno libre y, se puede conseguir mediante los siguientes procedimientos:

- a) Añadiendo un segundo anticuerpo específico para el utilizado primeramente, que determina la precipitación del antígeno ligado al anticuerpo primitivo.
- b) Adsorción del antígeno libre sobre carbón vegetal.
- c) Precipitación del anticuerpo por sulfato amónico.

Finalmente, una vez medida la radioactividad del antígeno libre y del ligado al anticuerpo, se construye una curva patrón, que relacione la cantidad adicionada de antígeno con el porcentaje de antígeno marcado ligado por el anticuerpo. A medida que la cantidad de antígeno no marcado aumenta, disminuye la de antígeno marcado fijado.

por el anticuerpo. La proporción de antígeno no marcado, en una muestra determinada, se calcula por medio de la curva patrón.

La aplicación de este método tiene las siguientes limitaciones:

- a) El procedimiento de marcado de la proteína o antígeno con el isótopo no debe alterar su comportamiento inmunológico.
- b) El antígeno marcado debe ser soluble en un 40-50% de sulfato amónico saturado.
- c) El sistema de fraccionamiento no debe alterar el equilibrio establecido entre el antígeno ligado al anticuerpo y el libre, antes de la adición del sulfato amónico saturado.
- d) Es conveniente que el isótopo empleado emita radiaciones gamma, ya que así, se efectúa la medida de la radioactividad con mayor rapidez y facilidad.

#### II.E.2. MICROFIJACION DEL COMPLEMENTO.

La reacción de fijación del complemento se conoce desde hace más de setenta años, pero la microtécnica ha sido desarrollada mucho después, especialmente para poder trabajar con antígenos solubles y anticuerpos, a concentraciones muy bajas (Wasserman y Levine, 1.961). Este método es particularmente sensible para establecer diferencias entre proteínas antigénicamente próximas. Además la microfijación del complemento, sirve para estudiar las semejanzas o diferencias de las secuencias de aminoácidos (Prager y Wilson, 1.971).

Presenta como ventajas más notables, que las cantidades necesarias de antígeno y antisuero, para efectuar la prueba, son unas cien veces menores que para la fijación del complemento convencional. Su sensibilidad ha permitido establecer diferencias entre diversas especies de primates, en relación con la albúmina sérica (Sarich y Wilson, 1.965), entre las hemoglobinas A, S y C (Reilich y col., 1.964), así como valorar las reacciones cruzadas por el cálculo de la denominada "distancia inmunológica" (Sarich y Wilson, 1.966).

Como desventajas más notables citaremos el hecho de que, la acción de metales, aminos, agentes quelantes, enzimas, etc., puede llegar a inhibir la actividad hemolítica del complemento.

El método se basa en que el complemento (presente en el suero fresco de cobaya) tiene dos características: su posibilidad de unirse irreversiblemente a los complejos antígeno-anticuerpo y su capacidad de lisar los hematíes sensibilizados por la hemolisina. Si hay correspondencia entre antígeno y anticuerpo, el complemento se fija al sistema. Si por el contrario, el complemento queda libre, lisa los hematíes sensibilizados por la hemolisina, que se han adicionado posteriormente. Finalmente, para valorar la lisis producida se eliminan por centrifugación los eritrocitos no lisados, midiéndose espectrofotométricamente la concentración de hemoglobina del sobrenadante. La fijación del complemento es inversamente proporcional a la concentración de hemoglobina.

### II.E.3. AGLUTINACION DE PARTICULAS INERTES.

La aglutinación de partículas inertes sobre las que se ha adsorbido un antígeno o proteína soluble, proporciona un buen sistema para titular precipitinas.

Se ha discutido si este tipo de pruebas eran reacciones de precipitación (Zinser y Heidelberger, 1.939) o de aglutinación (Heidelberger y Kabat, 1.937), aunque en realidad, son una combinación de ambas, que permite valgar un antígeno soluble frente a un inmunosuero, aprovechando el fenómeno visible de la aglutinación de la partícula. Para ello se ha utilizado colodión (Goodner, 1.941), bentonita, partículas de latex (Singer y Plotz, 1.956), carbón coloidal o células (como bacterias o hemáties) que se recubren con el antígeno.

Para efectuar la prueba, se enfrentan cantidades constantes de partículas sensibilizadas, a diferentes diluciones del antisuero. La lectura de la aglutinación se puede realizar en tubo (partículas de colodión) o en portaobjetos (partículas de bentonita o carbón coloidal).

Estas reacciones se han aplicado al diagnóstico de enfermedades bacterianas, triquinosis y ascariidiasis (Gonzalez-Castro y Rodriguez-Burgos, 1.961) con resultados satisfactorios, ya que, presentando un grado de sensibilidad análogo a las reacciones de fijación del complemento, su especificidad (menor porcentaje de falsas reacciones positivas) era más elevada.

#### II.E.4. REACCION DE PRECIPITACION.

La precipitación es el resultado final visible de la reacción serológica que puede tener lugar entre un antígeno o proteína soluble y el antisuero correspondiente.

Si la prueba se prepara de modo que las cantidades de proteína sean variables y constante la proporción de antisuero, se podrán observar tres zonas:

- a) En la que hay un exceso de anticuerpos en el sobrenadante.
- b) Denominada "zona de equivalencia" en la que no hay ni antígeno ni anticuerpo detectable en el sobrenadante y, que se corresponde con la máxima precipitación.
- c) En la que existe un exceso de antígeno. En este último caso, la apreciación del grado de precipitación es menor, como consecuencia de un mecanismo de inhibición, denominado "fenómeno de zona".

La reacción de precipitación puede aumentar su sensibilidad cuando se efectúa a través de las técnicas denominadas del anillo y del tubo capilar. Esta última es una modificación de la primera en la que se coloca cuidadosamente la correspondiente dilución del antígeno o proteína sobre el inmunosuero. Al cabo de algunos minutos, aparece, en caso positivo, una zona de precipitación que gradualmente va aumentando. Al emplear una serie de diluciones diferentes del antígeno podremos, una vez efectuada la lectura de la prueba, llegar a establecer la concentración de la solución antigénica. Es indudable que, al efectuar esta reacción habrá que tener presente la posible aparición del citado fenómeno de zona.

En nuestro trabajo hemos preferido emplear este método en el control del proceso de inmunización de los conejos, a través de la determinación del título de precipitinas del suero, que como técnica para análisis antigénico de una mezcla protéica heteróloga, ya que, presenta dificultades para reproducir los resultados que podrían obtenerse en una serie de determinaciones (Kabat y Mayer, 1.948).

En cuanto al mecanismo de la reacción de precipitación existen diversas hipótesis que tratan de explicarlo. Recordemos que las más conocidas son las de Ehrlich (1.906), Arrhenius (1.907), Bordet (1.920), Marrack (1.938) y Pauling (1.948), cuya complejidad aumenta en relación con los actuales conocimientos sobre química, física y matemáticas. Hoy día, se considera que la especificidad inmunológica se basa en:

- a) Las reacciones inmunológicas y, entre ellas la precipitación, se caracterizan por la rápida unión del antígeno y el anticuerpo (Small, 1.966), seguida de la visualización del precipitado que puede modificarse por la naturaleza del antígeno o del anticuerpo, por la temperatura (Burnet y col., 1.937), los electrolitos u otros factores (Jerne y Skousted, 1.953).
- b) El antígeno y el anticuerpo se combinan a través de estructuras superficiales, de configuraciones y tipos de fuerzas o enlaces complementarios.
- c) El complejo comprende un entramado de moléculas de antígeno y anticuerpo que se disponen de forma alternante. Los agentes reaccionantes pueden ser bi o multiva-

lentes y, en consecuencia, hacen posible su unión en proporciones variables.

La precipitación se ha empleado en la detección de antígenos bacterianos, identificación de bacterias (Streptococcus, Klebsiella, Haemophilus y Neisseria), diagnóstico de la sífilis, presencia de proteína C reactiva, pruebas de Medicina Legal y en el estudio de las relaciones taxonómicas entre diferentes grupos y especies animales (Taylor, 1.952; Weitz y Glasgow, 1.956).

Actualmente, estas reacciones de precipitación en tubo capilar se emplean, únicamente, como pruebas presuntivas en la identificación de un antígeno proteico, ya que, cuando se utilizan extractos tisulares de especies animales afines, se obtienen con frecuencia falsas reacciones positivas a causa de que, el inmunosuero producido frente a estas especies, puede reaccionar con determinantes antigénicos de especies heterólogas próximas. De ahí que, hoy en día, estas deficiencias de especificidad se combatan con la utilización de técnicas de precipitación, en medios gelificados (inmunodifusión e inmunoelectroforesis), que permiten diferenciar los sistemas reaccionantes y detectar, incluso, las reacciones de identidad que puedan tener lugar.

#### II.E.5. INMUNODIFUSION EN AGAROSA.

Este método se basa en la primitiva técnica de Oudin (1.946), de inmunodifusión en una dimensión.

Las soluciones antigénicas y el inmunosue-

ro se sitúan en pocillos practicados en el medio gelificado de tal modo que, al difundir los elementos reaccionantes, se forma una línea de inmunoprecipitación en la zona de equivalencia del sistema. Cada precipitado actúa como una barrera inmuno-específica para el correspondiente complejo antígeno-anticuerpo e impide su posterior difusión, aunque resulte permeable a otros sistemas. Por lo tanto, si las concentraciones de antígeno y antisuero están equilibradas, la línea o arco de precipitación que se forma no emigrará y se intensificará a lo largo del período de difusión. Si, por el contrario, no hay equilibrio entre los elementos que reaccionan, el exceso de uno de ellos puede movilizarse o emigrar, dando incluso múltiples precipitados, al solubilizarse y reprecipitarse posteriormente.

Es un método de sencilla realización y que puede utilizarse para el análisis antigénico de muestras complejas, así como, para el estudio de las relaciones antigénicas entre diferentes extractos protéicos. Por estas características se consideró como técnica de elección en el presente trabajo.

También puede tener aplicación para valorar semicuantitativamente el título de uno de los elementos reaccionantes (antígeno o anticuerpo), frente a concentraciones conocidas del otro (Feinberg, 1.959). Al difundir a través del gel, la posición de la línea de precipitación define indirectamente la concentración de antígeno o anticuerpo, en función del recíproco de la dilución presente en el pocillo. La estimación cuantitativa directa de las sustancias que reaccionan es posible al



efectuar las mediciones de los precipitados que se forman, después de un tiempo determinado. Sin embargo, como esta distancia es muy reducida, este procedimiento está sujeto a errores importantes.

Las pruebas de doble difusión se emplean más que las de difusión simple por ser más sensibles, como consecuencia del fenómeno de concentración producido por la barrera de precipitación.

Las limitaciones que la mayor parte de los investigadores achacan a esta técnica son:

- a) La posibilidad de que confluyan o se superpongan dos o más líneas, con la consiguiente dificultad para identificarlas. En este sentido, un sistema complejo sería más fácilmente analizado por una combinación de electroforesis e inmunodifusión (inmunoelectroforesis).
- b) El exceso de antígeno o anticuerpo determina que una línea dé lugar a varios arcos de precipitación que pueden conducir a resultados erróneos (Burtin, 1.954; Kaminski, 1.955; Jennigs, 1.956). Por otro lado, la observación de líneas de precipitación múltiples se podría también interpretar como que existen diferentes fosfolípidos unidos al antígeno (Hackenbrock y Hammon, 1.975), u holoenzimas, en el caso de que el extracto antigénico sea de origen tisular (Poyton y Schatz, 1.975).

La inmunodifusión en gel presenta mayor sensibilidad que las pruebas de precipitación en tubo (Herrman y Kotter, 1.968). En relación al análisis de extractos cárnicos crudos o parcialmente tratados por calor, el límite de sensibilidad es de alrededor de 0,5-1% en peso, cuando

se enfrentan a antisueros con un título de precipitinas entre 1/6.000 y 1/8.000 (Flego, 1.976). El método de inmunodifusión, de acuerdo con Fugate y Shelton (1.971), es relativamente rápido y sus resultados válidos para diferenciar extractos cárnicos de diversas especies domésticas.

Los análisis efectuados por esta técnica tienen como ventaja fundamental la visualización de reacciones de identidad que permiten comparar, frente a un inmunosuero común, un antígeno purificado con una mezcla o solución antigénica compleja. Además de las reacciones básicas de identidad y de no identidad, también se pueden observar reacciones de inhibición total o parcial.

#### II.E.6. IMMUNODIFUSION RADIAL.

Entre los métodos para determinar la cantidad de proteína se incluye la inmunoprecipitación cuantitativa en medios gelificados. La precipitación cuantitativa fué desarrollada por Heidelberger y Kendall (1.929), y se fundamenta en la observación de que la adición de cantidades crecientes de un antígeno soluble a una serie de placas o tubos, que contengan un volumen constante de antisuero, dá lugar a un aumento del precipitado hasta alcanzar un valor máximo.

Se puede construir una curva patrón que relacione el área del precipitado con la cantidad de antígeno, en presencia de un exceso de anticuerpos. Por otra parte, los métodos para medir la cantidad de proteína precipitada no son muy sensibles, por lo que se han arbitrado otros procedimientos para valorar o medir la cantidad de

antígeno.

Frecuentemente se emplean medios a base de agar o agarosa, en los que pueden reaccionar las soluciones de antígeno y antisuero, siendo precisamente las técnicas que incorporan el antisuero al gel, las que han proporcionado los mejores resultados.

El antígeno puede valorarse por este método de inmunodifusión radial, habiéndose comprobado (Mancini y col., 1.965) que la desviación estandar de las determinaciones de antígeno no supera al 2% de la media. La concentración de antígeno, alrededor del pocillo, es inicialmente lo suficientemente elevada como para que se formen inmunocomplejos solubles, hasta que llega un momento en que la concentración antigénica desciende y es insuficiente para que tenga lugar la precipitación. De este modo, llega a formarse un anillo o área de precipitación alrededor del pocillo del antígeno. La determinación del valor de este área indica la cantidad de antígeno que ha reaccionado y puede ser relacionado linealmente.

Este método es más sensible que la técnica de Oudin, llegando a detectar 0,0025 microgramos de antígeno, cuando se ha diluido convenientemente el antisuero y cuando se emplean procedimientos para teñir la zona de precipitación.

La dilución del antisuero incrementa la sensibilidad de la prueba, pero la intensidad del anillo de precipitación disminuye simultáneamente, por lo que puede llegar a dificultar la medición del diámetro correspondiente.

Otra forma de favorecer la sensibilidad es aumentar el volumen o la concentración del antígeno, para lo que debe tenerse presente que para comparar los resultados obtenidos con diferentes soluciones antigénicas éstas se han de preparar con idénticos volúmenes de solvente y depositarse en pocillos de las mismas dimensiones.

Se incrementa también la sensibilidad de la prueba mediante la utilización de anticuerpos marcados con isótopos (Rowe, 1.969), así como aumentando la densidad del precipitado por tinción o aplicando un antisuero que reaccione con los anticuerpos (Rünke y Beekveldt-Kielich, 1.969).

Este método se ha utilizado para valorar cuantitativamente toda una variedad de proteínas séricas (Augener, 1.964), así como, en la determinación de prealbúmina de roedores (Rünke y Thung, 1.964). Tomasi y Zigelbaum (1.963), han utilizado un procedimiento similar para la valoración de gammaglobulinas de lactantes. Recientemente ha servido para analizar cualitativa (Mancini y col., 1.970) y cuantitativamente (Hash y col., 1.970), las reacciones antigénicas entre diferentes sustancias o proteínas.

#### II.E.7. INMUNOELECTROFORESIS.

Es una técnica que combina la electroforesis previa de una proteína o antígeno con la inmunodifusión de Ouchterlony. En consecuencia, los componentes de una mezcla compleja pueden quedar definidos por sus movi-

lidades electroforéticas y por sus especificidades antigénicas.

Actualmente, tiene más ventajas y aplicaciones el micrométodo (Scheidegger, 1.955), que la técnica original (Grabar y Williams, 1.953). Tanto en uno como en otro caso, la muestra de la solución antigénica se aplica en un pocillo practicado en la porción central de una placa de vidrio recubierta con el medio gelificado. La electroforesis permite separar la mezcla antigénica en varias zonas. A partir de la trinchera, paralela al eje longitudinal de la placa, difunde el antisuero, que termina por dar lugar a los arcos o líneas de precipitación, cuando se alcanzan los niveles de equivalencia y reacciona con el antígeno.

Como geles se han empleado medios a base de agaropectina, agar y agarosa (Araki, 1.937). Esta última sustancia al no poseer grupos ionizables, prácticamente, no da lugar a fenómenos de electroendósmosis o contracorriente, ni a interacciones inespecíficas con ciertas proteínas básicas como la lisozima (Uriel y col., 1.964). Por otra parte, la agarosa soporta bien la electroforesis realizada a pH ácido.

El acetato de celulosa (Hohn, 1.958; Lomanto y Vergani, 1.967), tiene el inconveniente de que presenta dificultades para absorber el volumen, relativamente grande, de la solución de antisuero que requiere la técnica.

Los geles de almidón (Smithies, 1.955, 1.959) exigen una metodología larga y laboriosa al tener que efec-

tuar la electroforesis y la inmunodifusión en etapas diferentes.

La inmunolectroforesis en gel de poliacrilamida (Antoine, 1.955; Keutel, 1.964), es muy empleada en la actualidad y su aplicación está muy indicada cuando se precisa trabajar en condiciones extremas de pH, o realizar caracterizaciones enzimáticas.

La solución tamponada o buffer influye en la movilidad electroforética y en la posición del inmunoprecipitado. Por otro lado, ciertos tampones, pueden llegar a cambiar o modificar la movilidad de las fracciones proteicas por quelación de determinados iones metálicos. Otros iones inorgánicos o polielectrolitos naturales, como el ácido hialurónico a pH 8,6, disminuyen la movilidad de la albúmina al unirse a la misma (Pigman y col., 1.961).

Los métodos inmunolectroforéticos, para la identificación de antígenos o fracciones antigénicas, requieren observar los siguientes criterios:

- a) La propia movilidad electroforética.
- b) La utilización de sueros monoespecíficos para cada componente antigénico.
- c) El empleo de reacciones de caracterización por tinción para llegar a detectar una actividad enzimática u otro tipo de especificidad biológica.
- d) El gel puede fragmentarse y, de este modo, facilitar la separación de los inmunoprecipitados.

La inmunolectroforesis puede aplicarse, en algunos casos, para separar ciertos grupos del antígeno que causan modificaciones en la movilidad electroforética,

pero que no influyen en las propiedades inmunológicas del propio antígeno. Así, la movilidad electroforética de las glicoproteínas se puede cambiar al eliminar restos de carbohidratos que no sean ácido siálico, como en el caso de la transferrina del líquido cerebroespinal (Parker y Bear 1.962; Parker y col., 1.963).

Además, la movilidad puede también modificarse por factores físicos, como ocurre con las proteínas irradiadas que se fragmentan en subunidades de diferentes movilidades y propiedades inmunológicas iguales (Grabar y col., 1.955).

En ciertos casos, aparecen falsos precipitados, que no están producidos por reacciones inmunológicas específicas (Berembaun y col., 1.962), como ocurre en el caso de los antígenos lipídicos o de las lipoproteínas escasamente hidrosolubles (Niece y Barret, 1.963).

Entre las limitaciones más importantes que pueden achacarse a las técnicas inmunoelectroforéticas, señalaremos la derivada de las diferentes respuestas antigénicas de los animales en los que se obtiene el inmunosero, lo que indudablemente, dificulta la reproductibilidad del método, aunque es de señalar, que este inconveniente es común a otros métodos analíticos de base inmunológica. Así, se ha comprobado que tanto en el caballo como en el ratón, puede haber una variación de los anticuerpos, en las diversas etapas del proceso de inmunización (Clausen y Heremans, 1.960). También se atribuye a deficiencias del método, la presencia en el inmunoelec-

troferograma de zonas con muchas líneas de precipitación y, por lo tanto, de difícil lectura. En este caso, el problema se resuelve mediante la utilización de sueros absorbidos.

Aunque la inmunoelectroforesis es menos sensible que la inmunodifusión, debido a la dilución que tiene lugar durante la electroforesis, es indudable que presenta, en general, bastantes ventajas. Entre ellas, la capacidad de separación de mezclas antigénicas complejas, debido al poder resolutivo adicional de la electroforesis. Además, los componentes o fracciones protéicas pueden identificarse mediante el estudio comparativo de cada arco o línea individual, con la formada por una proteína o antígeno monoespecífico que se añade en un pocillo próximo al utilizado para la muestra polivalente. Por otra parte, el antisuero polivalente, como ya hemos mencionado, puede absorberse con un antígeno puro y, a continuación, establecer la correspondiente comparación con el antisuero no absorbido.

Las ventajas reseñadas permiten explicar la extensa aplicación de esta técnica para la separación y caracterización de proteínas o sustancias en general, con capacidad antigénica. Ha servido para el estudio de antígenos bacterianos (Patte y col., 1.956), víricos (Pereira y col., 1.959), parasitarios (Tormo y Chordi, 1.965; Tormo y col., 1.966), extractos y líquidos biológicos (Grabar y Burtin, 1.964; Clausen, 1.963), fracciones plasmáticas (Clausen y Heremans, 1.960; Tormo y col., 1.967), y sus alteraciones en procesos patológicos (Scheiffart y Götz, 1.960; Wunderly, 1.961) e inmunoglobulinas (Cawley,



1.969; Ritzman y Levin, 1.969). Además, esta técnica se ha utilizado para resolver otros problemas de base biológica, como han sido: la detección de proteínas idénticas en productos naturales diferentes (Frick y Scheidseidel, 1.957), el control de homogeneidad o modificaciones en proteínas (Lapresle y Grabar, 1.957), así como en estudios taxonómicos (Scheiffarth y col., 1.957) y embriológicos (Scheidegger y col., 1.956).

#### II.E.8. HEMAGLUTINACION PASIVA.

Los eritrocitos de oveja, conejo, humanos del grupo O, etc., pueden tratarse con proteínas o polisacáridos purificados, así como, con extractos celulares de bacterias, rickettsias, hongos patógenos, protozoos y helmintos dando lugar a un soporte antigénico idóneo para la detección y titulación de los correspondientes inmunosueros. Para ello, es preciso contar con los controles que garanticen que los anticuerpos presentes se corresponden con los antígenos absorbidos y no hayan sido producidos, de forma natural, por los eritrocitos.

Los hematíes pretratados con ácido tánico son capaces de adsorber proteínas y llegar a titular anticuerpos que se encuentran a pequeña concentración (Shioiri, 1.964).

Se trata de sistemas muy sensibles, que pueden llegar a evidenciar niveles de 0,02 a 0,04 microgramos de anticuerpos, y dar lugar a una hemaglutinación visible.

La conservación de los eritrocitos puede efectuarse mediante el empleo de soluciones de formol (In-

grahan, 1.958; Smith, 1.964), aldehído pirúvico (Ling, 1.961) glutaraldehído (Tokuda y Warrington, 1.970) y ácido sulfosalicílico (Brecht, 1.948), lo que favorece la estandarización de la técnica.

Aunque el método de tanización de los hematíes antes de su sensibilización es el más aceptado, también se han utilizado otras sustancias químicas que facilitan la unión del antígeno a los eritrocitos, como la bencidina (Pressman y col., 1.942), cationes metálicos (Jandl y Simmons, 1.957) que se aplican sobre todo para antígenos protéicos (Fudenberg y col., 1.964), difluordinitrobenceno (Ling, 1.961) y 2-4-diisocianato de tolueno (Gyenes y Sehon, 1.964).

El estado físico del antígeno parece influir en su avidez para fijarse a las células. La sensibilización es óptima cuando el antígeno está disgregado o parcialmente desnaturalizado (Singer y col., 1.962; Wolberg y col., 1.970). Al parecer se debe a que el antígeno, en estas condiciones, presenta mayor proporción de grupos cargados positivamente, que facilitan su unión a los hematíes (Mauser y col., 1.963).

Los eritrocitos pueden adsorber varios antígenos simultáneamente e, incluso, existir receptores específicos para componentes antigénicos diferentes. La concentración de la solución antigénica, necesaria para recubrir las células, varía de uno a otro antígeno y, en todo caso, debe determinarse previamente. En general, la concentración óptima de un antígeno varía entre 0,1 y 10 mg. por ml., aunque los hematíes pueden, en determinadas circunstancias, sensibilizarse con cantidades vestigiales de antígeno (Stavitsky, 1.954).

En cualquier caso, parece existir una relación directa entre la cantidad de antígeno que se pone en contacto con los hematíes y su sensibilidad respecto al inmunosuero (Wolberg y col., 1.969).

También es preciso tener presente que, para conseguir resultados reproducibles, la concentración de hematíes que van a ser sensibilizados con el antígeno, debe estandarizarse ya que existe una relación inversa entre concentración de eritrocitos y título de anticuerpos.

La ventaja más notable de la hemaglutinación pasiva es, sin duda, su extraordinaria sensibilidad, que permite trabajar con títulos de anticuerpos muy inferiores a los necesarios para las técnicas inmunológicas habituales (Carpenter, 1.975). Este aumento de la sensibilidad de la reacción se debe, al parecer, a que en la hemaglutinación intervienen no sólo los anticuerpos precipitantes sino también los bloqueantes o incompletos (Gordon y col., 1.958; Coombs y col., 1.953).

Entre las limitaciones de esta técnica citamos que no todos los antígenos son capaces de fijarse a los glóbulos rojos (Borduas y Grabar, 1.953). Por otra parte, la posibilidad de que las células se sensibilicen simultáneamente con dos antígenos diferentes, obliga a ser muy cautos a la hora de interpretar los resultados obtenidos con mezclas complejas o antígenos impuros (Lecocq y Linz, 1.962).

En ciertas ocasiones existen antígenos que, como las toxinas, contienen aglutininas que podrían invalidar la reacción si no fueran previamente eliminadas antes de proceder a la adsorción de las células (Heller y col.

1.952; Fulthorpe, 1.962).

Sería prácticamente imposible enumerar las aplicaciones de la hemaglutinación. A título de ejemplos, citaremos la utilización de esta reacción en el estudio de las propiedades físicas del inmunosuero frente a la seroalbúmina bovina (Benedict y col., 1.962), de antígenos tisulares normales y neoplásicos (Björklund y Paulsson, 1.962) mononucleosis infecciosa (Burnet y Anderson, 1.946), anti-toxinas (Fehon y Scott, 1.961), anticuerpos no precipitantes (Gordon y col., 1.958), antígenos hidatídicos (Chordi y col., 1.962), proteínas animales (Hirata y Stashak, 1.965) y proteínas extrañas en productos cárnicos (Bessemans y Lambion, 1.972).

40 m

OBJETO DEL TRABAJO

### CAPITULO III.

#### OBJETO DEL TRABAJO.

Como hemos tenido ocasión de comprobar al revisar la bibliografía que se ocupa de la separación e identificación de proteínas, los métodos de base bioquímica son complicados y laboriosos y, en ocasiones, incapaces de diferenciar proteínas estructuralmente muy próximas, como ocurre con las de carácter soluble, que entran a formar parte del tejido muscular de las especies animales domésticas. De estos métodos, sólo utilizaremos la electroforesis en gel de poliacrilamida, pues creemos interesante conocer el comportamiento electroforético de los extractos protéicos a estudiar, antes de someterlos al análisis inmunolectroforético.

El objeto de este trabajo consiste fundamentalmente en estudiar las proteínas solubles, procedentes del tejido muscular esquelético de varias especies animales (vaca, caballo, cerdo, perro y aves), por una serie de técnicas reconocidas como más adecuadas para analizar la composición antigénica de un extracto complejo. En este sentido, se utilizarán métodos de base bioquímica, como la electroforesis simple en gel de poliacrilamida, que no sólo permita obtener una diferenciación cualitativa en función de las movilidades electroforéticas de las distintas fracciones protéicas, sino también, alcanzar resultados cuantitativos basados en sus densitometrías.

Es indudable que los métodos inmunológicos son los más eficaces para analizar las diferentes proteínas

solubles presentes en un extracto cárnico, sobre todo si se controlan convenientemente sus niveles de especificidad y sensibilidad.

Para realizar la diferenciación e identificación de estos extractos por métodos inmunológicos, será necesario obtener, previamente, un inmunosuero de elevado título de anticuerpos. Para ello utilizaremos un lote de conejos, Nueva Zelanda, que inocularemos parenteralmente, con cada uno de los antígenos, adicionados con adyuvante completo de Freund. El control del proceso de inmunización se efectuará mediante la determinación del título de precipitinas en el suero de los animales inyectados.

Las pruebas serológicas se efectuarán, en primer lugar, entre sistemas homólogos para determinar la complejidad de cada extracto antigénico (en relación con el número de fracciones, movilidades, etc.) y, posteriormente, entre sistemas heterólogos para llegar a diferenciar los componentes específicos y explicar la presencia de posibles reacciones cruzadas.

La inmunodifusión en placa de Ouchterlony, no sólo es capaz de poner de manifiesto la comunidad antigénica entre los diversos extractos protéicos, sino que puede incluso, llegar a precisar si hay o no reacción de identidad entre las fracciones. Por ello, es una técnica insustituible, por su elevada especificidad, para conocer las fracciones responsables de posibles reacciones cruzadas. Los inconvenientes que puede presentar la inmunodifusión, cuando el número de componentes es elevado como consecuencia del limitado espacio del medio gelificado

sobre el que han de diferenciarse las fracciones, quedan superados por los métodos inmunolectroforéticos.

La inmunolectroforesis en gel de agarosa, permite aislar los componentes de un antígeno complejo por sus diversas movibilidades, al mismo tiempo que estas fracciones son detectadas como consecuencia de una correspondencia o especificidad antígeno-anticuerpo. Los arcos de precipitación inmunolectroforéticos se someterán a tinciones de caracterización inmunoquímica (glico y lipoproteínas) y, por otro lado, se clasificarán en componentes mayores y menores en función del tamaño, intensidad y nitidez de la línea. De este modo, intentaremos obtener una información lo más completa posible de las fracciones analizadas y, sobre todo, de las que aparezcan como específicas.

La prueba de inmunodifusión radial y la hemaglutinación pasiva son de carácter cuantitativo y de una elevada sensibilidad, por lo que pretendemos al estudiarlas comparativamente con la doble inmunodifusión e inmunolectroforesis, determinar qué título es preciso alcanzar en cada una de ellas, para que la reacción pueda considerarse específica.

Finalmente, con este trabajo pretendemos llegar a identificar los componentes protéicos solubles, de carácter **antigénico** que sean al mismo tiempo específicos para cada uno de los extractos cárnicos de las especies estudiadas. Creemos que la obtención de este objetivo facilitará la preparación de extractos con el mayor número de fracciones específicas y exentos de componentes comunes. La utilización de estos antígenos permitiría



conseguir resultados más satisfactorios, al emplearlos en las reacciones serológicas de alta sensibilidad y aplicables a la identificación de carnes o mezclas de carnes, procedentes de las especies animales analizadas.

## MATERIAL Y METODOS

#### CAPITULO IV.

##### MATERIAL Y METODOS.

##### IV.A. EXTRACTOS ANTIGENICOS.

###### IV.A.1. Preparación.

Se prepararon cinco extractos antigénicos que denominamos: PSC (proteína soluble de carne de cerdo), PSB (proteína soluble de carne de vaca), PSP (proteína soluble de carne de perro), PSCA (proteína soluble de carne de caballo) y PSPO (proteína soluble de carne de pollo).

La carne necesaria para la preparación del extracto antigénico PSC, procedía de la región de las agujas y estaba constituida principalmente por los Ms. intercostalis externi y Ms. trapezius.

En el caso del extracto antigénico PSB, la carne utilizada era de filetes de babilla, integrados por los músculos de la región femoral anterior: Ms. rectus femoris, Ms. vastus medialis y Ms. vastus lateralis.

El extracto antigénico PSCA se elaboró con parte del Ms. glutaeus superficialis y Ms. biceps femoris.

La carne para la preparación del extracto antigénico PSP se tomó del Ms. biceps femoris, Ms. sartorius y Ms. gastrocnemius.

Por último, en el caso del extracto antigénico PSPO, la carne utilizada procedía de los músculos que forman la pechuga.

Las distintas piezas de carne se trasladaron al laboratorio y se procedió a disecar los músculos, procurando eliminar al máximo tendones, aponeurosis y grasa.

En cada caso, se tomaron 250 g. de carne. Se picó lo más finamente posible y se llevó a un homogeinizador de cuchillas M.S.E. 7.700, hasta obtener una papilla uniforme. A continuación, la carne triturada se introdujo en un matraz que contenía 500 ml. de agua destilada y desionizada. El período de extracción de la proteína soluble duró sesenta minutos y se realizó en un refrigerador a temperatura controlada de 1°C. y en constante agitación. Seguidamente, se filtraron las muestras a través de papel Whatman nº 1 y, el extracto se distribuyó en matraces aforados de 50 ml. en los que finalmente se liofilizaba. Los matraces se sumergían en una mezcla de nieve carbónica y acetona y se les imprimía un movimiento de rotación para que el extracto se congelase ocupando la mayor superficie posible de las paredes del matraz, reduciéndose así el tiempo de liofilización.

Esta operación se efectuó en un liofilizador TP-3 con una superficie útil de carga de  $0,3 \text{ m}^2$ , dotado de equipo de registro, dispositivo de termovacio y programador. Se realizó en 18 horas, a una temperatura entre -10 y -5°C., alcanzándose un vacío del 45%.

El extracto antigénico liofilizado se conservó en un desecador, a temperatura constante de 1°C., hasta el momento de su utilización.

#### IV.A.2. Técnicas auxiliares.

##### IV.A.2.a. Método de Biuret.— Técnica de Chance y Readfearn, (1.961).

###### 1) Reactivos.

- 1.a.—  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ .....1,5 g.  
 Tartrato sódico potásico.....6 g.  
 Hidróxido sódico.....30 g.  
 Yoduro potásico.....1 g.  
 Agua destilada.....1.000 ml.

###### 1.b.— Colato sódico al 40%.

###### 2) Técnica.

A 15 mg. del liofilizado de cada extracto antigénico se añadían 5 ml. de agua destilada. Una vez conseguida la suspensión se tomaban 1,5 ml. a los que se adicionaban 1,5 ml. del reactivo de Biuret.

Después de treinta minutos de reposo se leyó la absorbancia a 540 nm. en un colorímetro Bauch Lomb Spectronic-20, frente a un blanco sin proteína. Los resultados se refirieron a la gráfica patrón de la figura 1, que se obtuvo a partir de una solución de seroalbúmina bovina de concentración conocida.

Ocasionalmente fué necesario añadir unas gotas de colato sódico al 40% para eliminar la turbidez de las muestras.

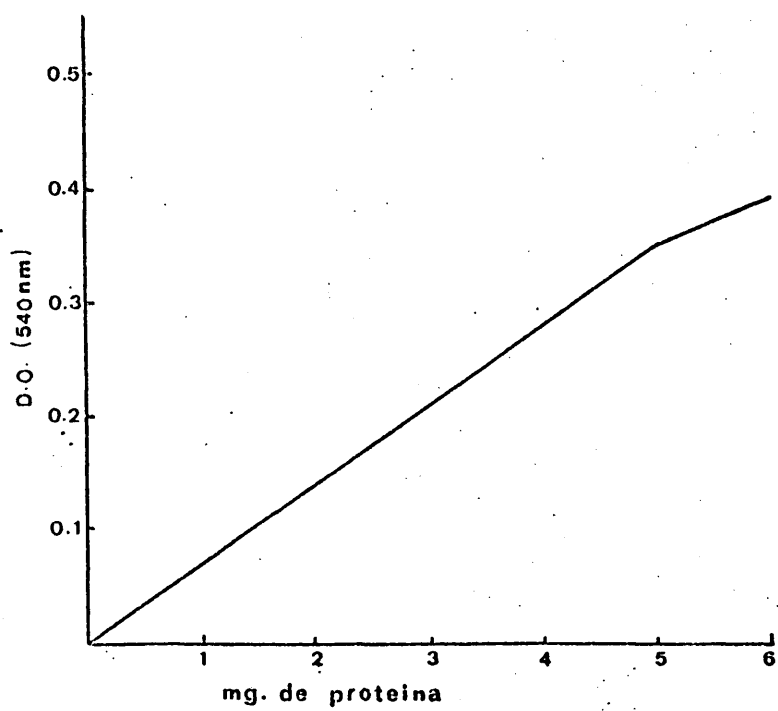


FIG. 1.- Gráfica patrón para las determinaciones de proteínas por el método de Biuret.

### 3) Construcción de la gráfica patrón.

Se pesaron 200 mg. de seroalbúmina bovina liofilizada y se disolvieron en 40 ml. de agua destilada. Cuando la proteína estuvo perfectamente disuelta, se transfirió a un matraz aforado de 50 ml. y se enrasó. Esta solución madre contenía 4 mg. de proteína por mililitro.

Para confeccionar la gráfica patrón se depositaron, por duplicado en tubos de ensayo, alícuotas de acuerdo con el esquema siguiente:

<u>Solución de proteína (ml.)</u>	<u>Aqua (ml.)</u>	<u>Concentración total de proteína (mg.)</u>
0,25	1,25	1
0,50	1	2
0,75	0,75	3
1	0,50	4
1,25	0,25	5
1,50	0	6

A continuación se añadieron, en cada tubo de ensayo, 1,5 ml. del reactivo de Biuret; se procedió a su agitación y se trató de acuerdo con la técnica general. La figura 1, muestra la gráfica patrón obtenida.

## IV.B. OBTENCION DE INMUNOSUEROS.

### IV.B.1. Pauta de inmunización.

Se emplearon conejos machos de 2,5-3 Kg. de

peso, de raza Nueva Zelanda.

Las inoculaciones se efectuaban, por vía subcutánea, a ambos lados de la espina dorsal, comenzando en la región más próxima a la zona cervical. Previamente, se depilaba y desinfectaba perfectamente la zona.

Las dosis empleadas eran de 48 mg. de extracto antigénico liofilizado, disueltos en 2 ml. de agua destilada. En algunas inoculaciones (tabla I), el extracto antigénico se inyectaba junto con 0,5 ml. de Adyuvante Completo de Freund (Tween 80, 1,5 ml.; aceite de parafina 8,5 ml.; Mycobacterium butyricum 5 mg.), preparado por Laboratorios Difco.

Las inoculaciones se sucedieron a lo largo de sesenta y dos días, a intervalos de cuatro y un período de descanso de ocho días, a partir de la inyección correspondiente al día 28.

Se hicieron cuatro sangrías parciales con el fin de comprobar la tasa de precipitinas del suero, antes y durante el proceso de inmunización. La sangre se obtenía de la vena marginal de la oreja. Para ello, se colocaba el animal en una caja apropiada que asegurara su sujeción, dejando libre únicamente la cabeza. La zona de la oreja elegida se friccionaba con un algodón empapado en xilol, con el fin de producir una vasodilatación que favoreciera la sangría. A continuación, se efectuaba la punción con una aguja, o bien, se seccionaba cuidadosamente el vaso con bisturí, recogién- dose, por goteo, de 5 a 10 ml. de sangre.

Cuando el recíproco del título de anticuerpos



TABLA I

Pauta de inmunización y sangría en el conejo, mediante inoculación de los diferentes extractos antigénicos y adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea.

Días	Extracto antigénico liofilizado.	Adyuvante C. de Freund	Sangría
1	48 mg.	0,5 ml.	S <sub>0</sub>
4	id.	-	-
8	id.	-	-
12	id.	0,5 ml.	S <sub>1</sub>
16	id.	-	-
20	id.	-	-
24	id.	-	-
28	id.	0,5 ml.	S <sub>2</sub>
36	id.	-	-
40	id.	-	-
44	id.	-	-
48	id.	0,5 ml.	S <sub>3</sub>
52	id.	-	-
56	id.	-	-
60	id.	-	-
62	-	-	S <sub>F</sub>

Cuando el recíproco del título de precipitinas, en la sangría parcial S<sub>3</sub> era igual o superior a 1.024, el proceso de inmunización se consideraba suficiente. Se realizaban tres inoculaciones más, para mantener el título y se procedía a la sangría final S<sub>F</sub>, cuarenta y ocho horas después de la última inoculación.

determinado por precipitación en tubo capilar, era igual o superior a 1.024 se daba por finalizado el proceso de inmunización y se procedía a la sangría final del animal.

#### IV.B.2. Sangría final.

El animal se colocaba en decúbito supino, sobre la mesa de operaciones; se sujetaba por las cuatro extremidades y se anestesiaba administrándole 10 mg. por Kg. de peso, de KETOLAR (Clorhidrato de ketamina), por vía intramuscular.

Se depilaba y desinfectaba perfectamente la zona inferior del cuello y, con material quirúrgico apropiado se practicaban las incisiones cutáneas siguientes:

- a) Longitudinal a lo largo de la línea media ventral;
- b) Transversal, a nivel de la segunda vértebra cervical;
- c) Transversal, a nivel de la sexta vértebra cervical.

A continuación, se van disecando los músculos ventrales del cuello visibles en este área: Ms. cleidomastoi-deus (parte del Ms. cleidoccephalicus y éste a su vez del Ms. brachiocephalicus), Ms. sternomastoi-deus (parte del Ms. sternocephalicus), Ms. sternohyoideus y Ms. sternothyroideus.

Por el borde lateral del Ms. sternohyoideus se diseca en profundidad, hasta llegar al paquete vasculonervioso situado a uno y otro lado de la tráquea (A. carotis co-munis, V. jugularis y Troncus vago-sympathicus).

Se diseca la A. carotis comunis y con una pinza "tipo mosquito" se fija el N. vagus, que continúa uni-

do al tronco vascular. De este modo, al efectuar la sección de la arteria podemos dirigir el flujo sanguíneo a un tubo o recipiente donde recogeremos la sangre.

Cuando disminuye el flujo de sangre, se recomienda dar masaje cardíaco con el fin de conseguir el mayor volumen de sangre posible.

De cada animal se recogieron 120-130 ml. de sangre, cuando la sangría final se realizaba de acuerdo con las normas señaladas.

#### IV.B.3. Obtención y conservación del suero.

La sangre extraída se vertía lentamente, en un tubo, a fin de evitar en lo posible la hemólisis.

Se centrifugaba a 1.500-2.000 r.p.m., durante diez minutos. Los hematíes se depositaban en el fondo y, se producía la formación del coágulo, que quedaba, en parte, adherido a las paredes del tubo.

Con una espátula o aguja se desprendía el coágulo de las paredes laterales y se volvía a centrifugar a 3.000 r.p.m. durante quince minutos. De esta forma se facilitaba la retracción del coágulo y quedaba el suero perfectamente separado.

El suero se extraía mediante jeringa o pipeta y se distribuía en viales a razón de 2 ml., junto con un par de gotas de solución de azida de sodio al 0,10% que actuaba como conservador.

Los viales, perfectamente cerrados, se con-

servaban en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}.$ , hasta el momento de su uso.

IV.C. PRUEBA DE PRECIPITACION EN TUBO CAPILAR, SEGUN LA TECNICA DE SWIFT - WILSON Y LANCEFIELD (1.943).

Como ya hemos señalado, esta reacción se aplicaba a los sueros obtenidos, a lo largo del proceso de inmunización, para controlar la respuesta antigénica de los diversos conejos empleados.

Se utilizaron tubos capilares de 75 X 1,5 mm. de diámetro. En primer lugar, se efectuaban diluciones dobles seriadas del extracto antigénico, comenzando por la 1/2 (24 mg. de antígeno liofilizado en 1 ml. de agua destilada). A continuación, en portaobjetos, previamente desengrasados, se iban depositando separadamente, una gota de la dilución del extracto antigénico y otra del inmunosuero.

Manteniendo el tubo capilar en posición horizontal, se establecía contacto con la gota del inmunosuero dejando que ascendiera por capilaridad, hasta una altura de unos 22 mm.. Seguidamente, se hacía la misma operación con la gota de la dilución del extracto antigénico, permitiendo que se introdujera en el tubo capilar, un volumen aproximadamente igual al anterior. El tubo se invertía, dejando una cámara de aire, de unos 10 mm. en la parte más baja del tubo. Los capilares preparados con las diferentes diluciones del antígeno se colocaban verticalmente en una gradilla con plastilina. La lectura se llevaba a cabo a los diez minutos y, posteriormente alas doce horas de incubación a la temperatura

ambiente. La reacción positiva se caracterizaba por la presencia en el tubo capilar, de un precipitado fino, que más tarde se sedimentaba formando un depósito en la base inferior del tubo.

La dilución más alta del extracto antigénico que permitía observar precipitado, se consideraba como título de la reacción.

#### IV.D. MÉTODOS DE INMUNODIFUSION.

##### IV.D.1. Inmunodifusión en gel, según la técnica de Ouchterlony, modificada por Chordi y Kagan, (1.964).

Básicamente, consiste en la difusión del antígeno y anticuerpo a través de un medio semisólido. Si existe correspondencia entre ambos, se formará una línea de precipitación cuya posición dependerá del coeficiente de difusión del antígeno y del anticuerpo, de sus respectivas concentraciones y del tiempo.

Esta técnica permite analizar un extracto antigénico frente a un inmunosuero homólogo, y es de gran utilidad para el estudio de las posibles comunidades e identidades de las fracciones antigénicas.

##### IV.D.1.a. Preparación del gel de agarosa.

Previamente se prepara el tampón de veronal azida de sodio (pH 8,6), cuya composición es la siguiente:

Dietil barbiturato sódico (veronal sódico)...9 g.  
 Azida de sodio.....0,5 g.  
 Acido clorhídrico 1 N.....10 ml.  
 Agua destilada.....1.000 ml.

Se disuelven 10 g. de agarosa en 1.000 ml. de agua destilada y desionizada, a 80-90°C., durante 30 minutos, al baño maría. A esta solución se añaden 1.000 ml. de tampón veronal azida de sodio (pH 8,6), agitando ligeramente mientras se efectúa la mezcla.

La solución de agarosa, así preparada, podía utilizarse inmediatamente o conservarse, a 4°C., distribuida en tubos cerrados, en el refrigerador.

#### IV.D.1.b. Preparación de las placas.

Las placas utilizadas eran portaobjetos de 7,5 X 5 cm. Previamente se desengrasaban hirviéndolos en mezcla crómica (30 g. de dicromato potásico; 700 ml. de ácido sulfúrico concentrado; 300 ml. de agua destilada). Se decantaba la solución una vez enfriada y, los portaobjetos se lavaban con abundante agua corriente y, después, con agua destilada. Se conservaban sumergidos por completo en acetona.

Los portaobjetos se secaban con una toallita de celulosa y, sobre cada uno de ellos, se depositaban 6,5 ml. de la solución de agarosa caliente, procurando que la gelificación se efectuara sobre una superficie horizontal perfectamente nivelada.

A continuación, se practicaban las excavaciones con un tubo de vidrio. Los discos de agarosa, una vez

cortados, se extraían aplicando una ligera presión negativa en el interior del tubo.

La disposición y tamaño de las excavaciones fué la siguiente: una excavación central de 12 mm. de diámetro y seis en roseta de 6 mm. de diámetro. La distancia entre el pocillo central y los periféricos era de 8 mm.

Este dispositivo se dibujaba en papel milimetrado, con el fin de poder disponer, en sucesivos ensayos de un modelo o patrón de idénticas medidas.

Antes de situar los antígenos y el inmunosero en las excavaciones, se depositaba en el fondo, una pequeña gota de la solución de agarosa fundida, para que las soluciones no se filtrasen entre la capa de gel y la superficie de la lámina de vidrio.

#### IV.D.1.c. Llenado de las excavaciones con los extractos antigénicos y el inmunosero.

Los extractos antigénicos liofilizados se disolvieron en tampón veronal azida de sodio (pH 8,6), a concentraciones apropiadas. Con ayuda de tubos capilares o pipetas Pasteur se procedía al llenado de las excavaciones.

Situábamos en el pocillo central el inmunosero y, periféricamente, las diluciones de los extractos antigénicos.

#### IV.D.1.d. Período de incubación.

Los portaobjetos preparados se introducían

cuidadosamente en placas de Petri. Se añadían, sobre el fondo de cada placa, unos 2 ml. de solución de azida de sodio al 1% para inhibir el crecimiento bacteriano, a la vez que se conseguía mantener cierto grado de humedad que evitaba la evaporación del contenido de los pocillos.

Las placas de Petri cerradas, se incubaban a 37°C.; las líneas de precipitación se formaban a las 18-24 horas de incubación.

#### IV.D.1.e. Lavado y secado.

Los portaobjetos se lavaban en solución salina al 0,9%, durante 48 horas. Se secaban con papel Whatman nº 1, cuidando de eliminar las burbujas de aire entre el gel y el papel. Una vez secos, el papel se humedecía con agua destilada y se desprendía de la superficie de los portaobjetos. Al conseguirse la evaporación del agua que contenía el gel, quedaba adherida a la lámina de vidrio una fina película, con las líneas de precipitación fijadas. En estas condiciones, los portaobjetos podían someterse a las técnicas de tinción.

#### IV.D.1.f. Tinción.

Los portaobjetos se sumergían durante 2 horas en una solución que contenía:

Negro amida 10 B.....	1 g.
Metanol.....	90 ml.
Acido acético.....	10 ml.



A continuación se lavaban durante treinta minutos en solución de ácido acético al 5%. Por último, se eliminaba el ácido con varios cambios de agua destilada.

Las placas se secaban al aire, o en estufa a 37°C.

#### IV.D.1.g. Lectura.

Se realizó de acuerdo con las cuatro reacciones tipo descritas por Ouchterlony (1.949, 1.962, 1.967), para un sistema de tres elementos, consistente en dos mezclas antigénicas que difunden a partir de dos excavaciones y, un inmunosuero desde un tercer pocillo, para llegar a formar las líneas de precipitación correspondientes.

Durante la difusión se pueden producir modificaciones en la regularidad de las líneas de precipitación, en el caso de que existan relaciones serológicas entre los antígenos.

En la lectura de estas placas podemos encontrarnos con cuatro casos diferentes (figura 2):

Reacción tipo I.— También denominada de identidad completa o de fusión completa de las líneas de precipitación.

Cuando dos antígenos son idénticos o tienen determinados grupos antigénicos en común y, el inmunosuero contiene únicamente anticuerpos frente a esas fracciones antigénicas comunes, las líneas de precipitación se funden por completo en la zona central. En ciertas ocasiones, los inmu-

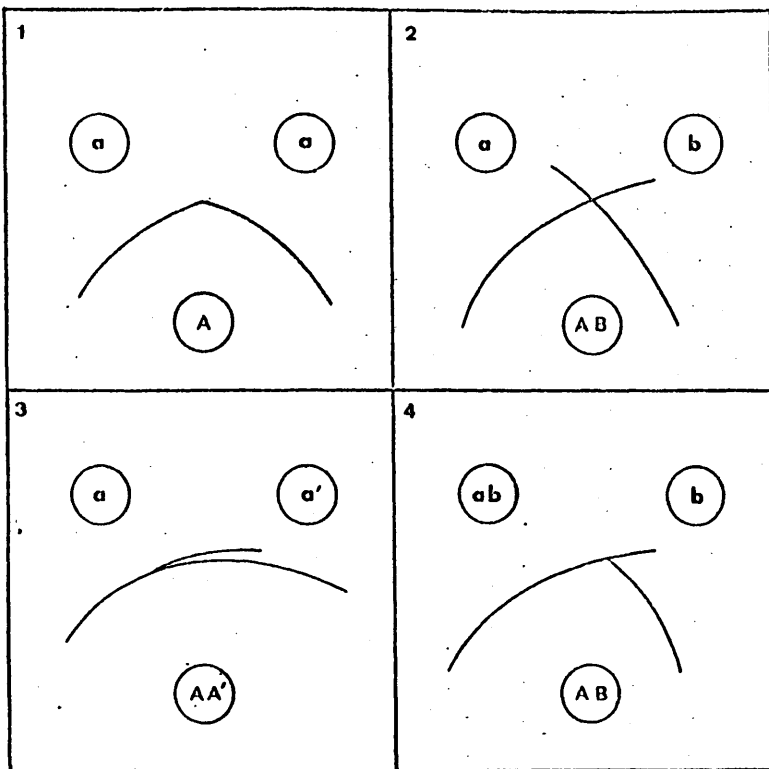


FIG. 2.- Reacciones tipo que pueden observarse al efectuar la lectura de las placas de inmunodifusión, por la técnica de Ouchterlony.

nocomplejos pueden dar lugar a cierto grado de difusión y producir falsas inflexiones.

Reacción tipo II..- Conocida con el nombre de "reacción de no identidad".

En este caso, existe intersección de los dos arcos de precipitación. El antisuero contiene anticuerpos diferentes frente a ambos antígenos, no existiendo ninguna relación entre los anticuerpos que intervienen en la reacción.

Reacción tipo III..- Denominada "reacción de identidad parcial" (Jennings y Kaplan, 1.960).

Esta reacción tiene lugar entre dos soluciones antigénicas que comparten algunos determinantes antigénicos pero poseen otros propios o específicos. En consecuencia, significa que existe cierto grado de relación entre los antígenos, pero que ésta no es idéntica.

Reacción tipo IV..- También conocida con la denominación "reacción de inhibición".

Este modelo se observa cuando existen antígenos multivalentes o fracciones antigénicas con determinantes diferentes. En este caso, el inmunocomplejo se determina por la forma en que difunden los antígenos comunes y la inflexión producida por los grupos antigénicos que sólo vehicula uno de los antígenos. La forma y localización de las líneas de precipitación depende de la concentración inicial de los reactivos y de sus respectivos coeficientes de difusión.

IV.D.2. Inmunodifusión radial, según la técnica de Mancini (1.964).

Este método se basa en el principio establecido por Oudin (1.946), para la difusión en una sola dimensión. Se emplea para la estimación cuantitativa de proteínas. Bajo las condiciones de la prueba, el área o cuadrado del diámetro del precipitado formado, durante la inmunodifusión del antígeno en el seno del medio gelificado con el inmunosuero incorporado, está en relación directa con la concentración del antígeno.

IV.D.2.a. Técnica.

La solución de agarosa al 1% en tampón de veronal azida de sodio (pH 8,6), se preparaba de igual forma que en la técnica de inmunodifusión de Ouchterlony.

El inmunosuero y la solución de agarosa se llevaban a un baño a 50°C. y, en un tubo de vidrio colocado en el mismo baño, se pipeteaban 6,5 ml. de la solución de agarosa y de 0,2 a 0,6 ml. del inmunosuero, según la concentración deseada. La mezcla se agitaba suavemente, evitando en lo posible la formación de burbujas.

A continuación, se vertía esta mezcla en un portaobjetos (7,5 X 5 cm.), colocado sobre una superficie horizontal perfectamente nivelada.

Mientras se producía la solidificación del medio, se hacían las diluciones del extracto antigénico en tampón veronal azida de sodio (pH 8,6).

Solidificada la mezcla inunosuero-agarosa se cortaron los pocillos con un tubo de vidrio de 2,5 mm. de diámetro. Después de extraer los discos cortados, se llenaban las excavaciones con micropipetas, poniendo en cada una 7 microlitros de las distintas diluciones del extracto antigénico.

Los portaobjetos así preparados, se introducían en placas de Petri, que contenían en su fondo, unos 2 ml. de solución de azida de sodio al 1%, que evitaba la contaminación bacteriana y mantenía la humedad apropiada.

Las placas se incubaban en estufa a 25°C..

#### IV.D.2.b. Lectura.

Todos los días, se medían los diámetros de los halos de precipitación. Cuando las medidas permanecían constantes durante 48 horas, se daba por terminado el proceso de difusión, que duraba por término medio de 6 a 7 días.

Como el área o el cuadrado del diámetro del halo de precipitación es directamente proporcional a la concentración del antígeno e inversamente proporcional a la concentración del inunosuero, se puede hacer una curva patrón que relacione estos parámetros.

IV.E. ELECTROFORESIS SIMPLE EN GEL DE POLIACRILAMIDA, SEGUN LAEMLI (1.970), MODIFICADA POR LEE Y COL., (1.975).

Básicamente consiste en someter, la sustancia a estudiar, a la acción de un campo eléctrico en el que la proteína en solución tampón emigrará hacia uno de los electrodos, cuando pase una corriente continua a través de la solución, siempre que esta operación se efectúe a un pH adecuado.

Entre los factores que rigen la movilidad pueden mencionarse: carga, peso y forma de las partículas; concentración, fuerza iónica y viscosidad del gel empleado; carácter e intensidad del campo eléctrico; pH y temperatura del solvente.

De acuerdo con estos factores, cada componente protéico presentará una determinada zona de emigración electroforética.

IV.E.1. Preparación de los geles.

Solución A (gel separador, con un 10% de acrilamida), cuya composición fué la siguiente:

Solución de acrilamida (22,2 g. de acrilamida;  
0,6 g. de NN'-metilen bisacrilamida; 100 ml. de  
agua destilada).....18 ml.

Tampón 1,5 Tris-ClH, con 0,4% de SDS (dodecil  
sulfato sódico), pH 8,8.....10 ml.

Solución de persulfato amónico al 1%.....1 ml.

Agua destilada y desionizada.....11 ml.  
 TEMED (NNN'N' tetrametiletilenodiamina).....0,03 ml.

Solución B (gel de apilamiento o de carga,  
 con un 3% de acrilamida), de composición:

Solución de acrilamida.....0,66 ml.  
 Tampón 0,5 M Tris-ClH, con un 0,4% de SDS,  
 (pH 6,8).....1,25 ml.  
 Solución de persulfato amónico al 1%.....0,1 ml.  
 Agua destilada y desionizada.....3 ml.  
 TEMED.....0,01 ml.

#### IV.E.2. Preparación de la muestra.

Se hizo según la técnica de Weber y Osborn,  
 (1.969).

Se pesaban 72 mg. de extracto antigénico  
 liofilizado y se disolvían en 15 ml. de agua destilada y  
 desionizada. Se añadían 0,2 g. de SDS y 1 mg. de DTT (Di-  
 tiotreitól).

La solución se incubaba a 40°C., durante  
 treinta minutos. Terminada la incubación se adicionaba  
 igual volumen de una solución de glicerol al 60%, para in-  
 crementar la densidad de la solución de proteína.

#### IV.E.3. Disposición de los geles y de la muestra.

Tubos de vidrio de 80 X 8 mm., se llenaron

con la solución A (gel de separación), hasta una altura de unos 5 mm. del extremo superior del tubo. La solución se depositaba cuidadosamente, dejándola deslizar por las paredes, con el fin de que no aparecieran burbujas de aire en su interior. Inmediatamente después, se adicionaban dos gotas de agua destilada, para evitar la formación de un menisco cóncavo.

Se esperaba su completa polimerización (1 hora a temperatura ambiente) y, se eliminaba el agua añadida invirtiendo los tubos y secando con ayuda de una tira de papel de filtro.

A continuación, se adicionaba la solución B (gel de avilamiento), hasta una altura de unos 3 mm. del extremo superior del tubo y se seguían los mismos pasos anteriormente descritos de adición de agua, polimerización completa y eliminación del agua añadida.

Por último, en cada tubo se colocaba una solución que contenía:

Mercaptoetanol.....	5	1.
Tampón de fosfato sódico 0,01 M (pH 7)...	50	1.
Solución de azul de bromofenol al 0,05%...	3	1.
Muestra.....	50	1.

#### IV.E.4. Período electroforético.

Los tubos de vidrio con los geles y la muestra se introducían en tampón pH 8,3 (0,3% de SDS; 0,192 M de glicina y 0,025 M Tris).



Un generador de tensión Canalco 1.200 equipado con una fuente de alimentación de la misma firma, permitía regular la intensidad entre 1 y 60 mA., y proporcionar así la corriente continua necesaria para realizar la electroforesis.

Inicialmente, se aplicó una corriente de 1 mA. por gel, hasta que el azul de bromofenol emigraba, atravesando completamente el gel de apilamiento (30 minutos). Después se aplicaron 2 mA. por gel, hasta el final de la electroforesis (4 horas, aproximadamente) (figura 3).

#### IV.F.5. Tinción y conservación.

Finalizado el desarrollo electroforético, se retiraron los geles de los tubos inyectando agua destilada entre el gel y la pared del tubo.

Los geles se colocaban en tubos de ensayo y se teñían con una solución que contenía: 0,4% de azul brillante de Coomassie; 50% de metanol y 9,2% de ácido acético, dejándola actuar durante doce horas.

Pasado este tiempo, se sumergían en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 9,2%, durante ocho horas para conseguir su decoloración.

Por último, los geles se conservaban en una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7,5%, hasta el momento de proceder a su lectura en un densitómetro óptico Joyce Loeb1, modelo Chromoscan 1.967.

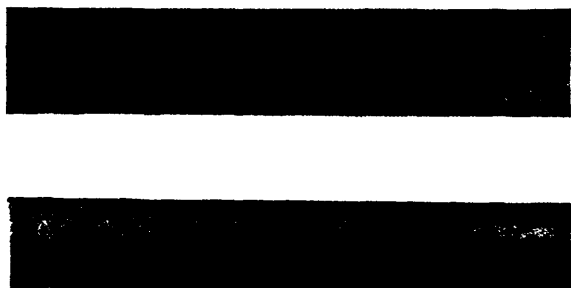


FIG. 3.- Reproducción fotográfica de electroforesis en gel de poliacrilamida, efectuadas con un sistema CANALCO 1.200. A partir de ellas se obtuvieron los trazados densitométricos y diagramas correspondientes a los diversos extractos antigénicos.

IV.F. INMUNOELECTROFORESIS EN AGAROSA, SEGUN LA TECNICA DE GRAPAR (1.953), MODIFICADA POR SCHEIDEGGER (1.955).

Esta técnica fué inicialmente desarrollada por Grabar y Williams (1.953). Se trata de un procedimiento en el que se combina la separación electroforética de los componentes de una sustancia o proteína compleja y, la técnica de inmunodifusión de Ouchterlony, que permite la precipitación específica de las fracciones, cuando difunden frente a un suero en un medio gelificado.

IV.F.1. Electroforesis simple en agarosa (pH 8,6).

La preparación del gel de agarosa, la limpieza y conservación de las placas se efectuaba de la misma forma que en la técnica de inmunodifusión de Ouchterlony, modificada por Chordy y Kagan, (1.964).

IV.F.1.a. Preparación de las placas.

Sobre una batea portaobjetos (SAF-2574), se ponían unas gotas de agua para formar una película completa bajo los portaobjetos, evitando así, que la agarosa fundida se depositara entre la batea y los portaobjetos.

A continuación, se colocaban en la batea, ocho portaobjetos de 7,5 X 2,5 cm., previamente secados con toallita de celulosa.

La batea con los portaobjetos se situaba sobre una mesa niveladora (SAF-2568). Se vertían 50 ml. de solución

de agarosa fundida y se pasaba sobre ella un filamento metálico, con el fin de eliminar el exceso de agarosa y asegurar una capa de gel fina y uniforme.

Se dejaba que la agarosa gelificase completamente, antes de retirar la batea de la mesa niveladora y, se procedía seguidamente, al corte de los pocillos y ranuras.

Se utilizó el cortador patrón Shandon (SAF-2580), adaptado para cortar la combinación de 3 pocillos de 1 mm. de diámetro y 2 ranuras de 60 X 1 mm. (véase figura 4). La separación entre pocillos y ranuras era de 3 mm.

También se cortó una excavación auxiliar de 1 mm. de diámetro, próxima al borde superior del portaobjetos, donde se colocaba el azul de bromofenol, que al emigrar visiblemente, se empleaba como control del tiempo del proceso de electroforesis.

La agarosa cortada correspondiente a los pocillos se extraía por medio de una pipeta Pasteur a la que se aplicaba una presión negativa.

#### IV.F.1.b. Disposición de los extractos antigénicos.

La batea con los portaobjetos se colocó en la cubeta de electroforesis, teniendo la precaución de que el tampón veronal azida de sodio cubriese los electrodos, y de que los puentes de papel Whatman nº 3, humedecidos en el propio tampón, quedasen perfectamente adheridos a los portaobjetos cubiertos con el gel de agarosa.

A continuación, se depositaba en cada pocillo, un microlitro de la solución del extracto antigénico, en

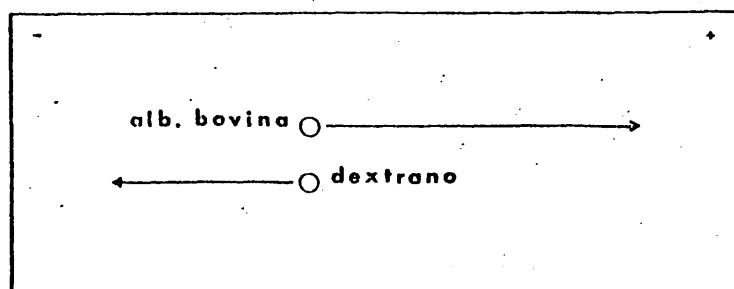
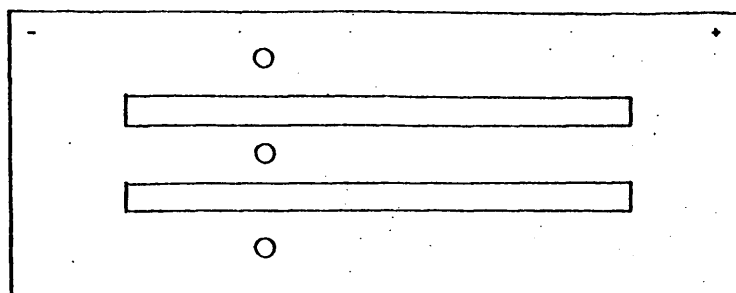


FIG. 4.- Modelo de portaobjetos de inmunoelectroforesis y placa control de electroforesis.

tampón veronal azida de sodio (pH 8,6), que interesaba someter a electroforesis.

En el pocillo auxiliar se depositaba una gota de solución de azul de bromofenol al 0,05%.

#### IV.F.1.c. Período electroforético.

Se empleó el generador de tensión Shandon modelo U-77 (SAF-2761), que puede utilizarse a voltaje constante (entre 0-300 voltios), o a corriente constante (entre 0-80 mA.).

El aparato se ajustó hasta conseguir una diferencia de potencial de 6 voltios por cm. que se medían en los extremos de los portaobjetos con un potenciómetro, y que al utilizar portaobjetos de 7,5 X 2,5 cm. representaba un total de 45 voltios.

El paso de la corriente se mantenía hasta que el azul de bromofenol llegase a 1 cm. del borde anódico del portaobjetos y, en ese momento, se daba por terminada la emigración electroforética. La duración, en nuestro caso, fué de unas 4 horas.

#### IV.F.2. Inmunodifusión en agarosa (pH 8,6).

##### IV.F.2.a. Técnica.

Una vez concluida la electroforesis simple, de acuerdo con la técnica de referencia, se añadía, en la trinchera longitudinal de los portaobjetos, el inmunosuero

preciso para completar el sistema.

A continuación, los portaobjetos se introducían en placas de Petri, añadiendo a cada una, 2 ml. de solución de azida de sodio al 1%, para inhibir el crecimiento bacteriano y conseguir un cierto grado de humedad que evite la evaporación del inmunosuero.

Se dejaba que la difusión durara 18-24 horas, a 37°C., hasta que llegaban a visualizarse los arcos de precipitación.

Las etapas correspondientes al lavado, secado y tinción de las placas, eran análogos a las descritas en el método de inmunodifusión.

#### IV.F.2.b. Cálculo de las movilidades electroforéticas.

1) Absolutas.— En primer lugar, se determinaba el desplazamiento de cada fracción antigénica desde el pocillo en el que se había depositado el extracto antigénico. Para ello, se calculaba el centro de cada arco. La distancia, medida en milímetros, entre la proyección del centro de cada arco y el centro del pocillo, se consideraba como desplazamiento.

Cuando la inmunoelectroforesis se llevaba a cabo en un gel como el agar o la agarosa, que no son eléctricamente neutros, aparece un fenómeno de electroendósmosis, representado por una fuerza de contracorriente que va del polo positivo al negativo y, por lo tanto, en sentido opuesto al de la emigración electroforética.

Así, el punto de partida o "punto cero" será aquél en el que se sitúe una sustancia inerte, inmóvil en un campo eléctrico, que se desplaza al polo negativo por efecto de la electroendósmosis. La sustancia inerte utilizada en este trabajo fué el dextrano.

Las movilidades absolutas (M.A.), de cada componente antigénico se calculaban en razón de su desplazamiento real, de la intensidad del campo eléctrico (voltios por cm.) y del tiempo, en segundos, que duró la electroforesis, de acuerdo con la fórmula:

$$M.A. = \frac{\text{Desplazamiento real (cm.)}}{\text{Voltios/cm. X sg.}}$$

Como la cifra resultante era muy pequeña, para uso normal, las unidades M.A. se multiplicaban por 100.000. De esta forma se expresaron en:

$$\frac{10^{-5} \text{ cm.}^2}{\text{Voltios X sg.}}$$

En nuestro caso, el campo eléctrico era de 6 voltios por cm. y la electroforesis duraba 4 horas aproximadamente (14.400 sg.).

2) Relativas.— Las movilidades relativas están referidas a otra sustancia de movilidad constante y conocida, que puede servir de referencia. En nuestro trabajo, esta sustancia fué la seroalbúmina bovina.

La movilidad relativa en relación con la seroalbúmina ( $U_x / U_{alb.}$ ), viene expresada por el cociente obtenido al dividir el desplazamiento real de cada componente



( $U_x$ ) por el desplazamiento real de la albúmina  $U_{alb.}$ .

3) Porcentuales.— Si la distancia entre la posición del dextrano y la posición de la seroalbúmina bovina es la movilidad de la albúmina, que consideramos equivalente al 100%; el cálculo de la movilidad electroforética relativa a la albúmina bovina puede conseguirse utilizando la fórmula siguiente:

$$\frac{B - D}{A - D} \times 100\%$$

Con lo cual, expresamos la movilidad relativa a la seroalbúmina bovina en porcentajes.

B, es la distancia desde la proyección del centro del arco de la banda de precipitación hasta el pocillo de partida del antígeno.

D, es la distancia recorrida por el dextrano desde el pocillo correspondiente hasta su nueva posición.

A, es la distancia recorrida por la albúmina desde el pocillo hasta su nueva posición después de la electroforesis (figura 5).

#### IV.G. CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE LAS FRACCIONES DEL INMUNOELECTROFFROGRAMA.

La técnica de inmunolectroforesis permite estudiar no sólo los componentes inmunolectroforéticos y sus movilidades sino que además es compatible con la utilización de tinciones inmunoquímicas que den información

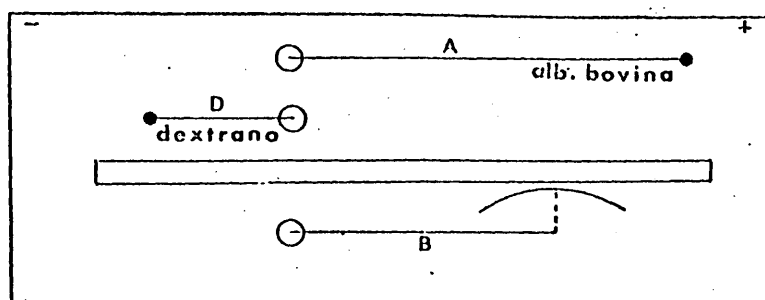


FIG. 5.- Esquema correspondiente a las posiciones de la fracción inmunoelectroforética, albúmina bovina y dextrano para calcular la movilidad porcentual.

A, distancia recorrida por la albúmina desde el pocillo hasta su nueva posición, después de la electroforesis.

B, distancia desde la proyección del centro del arco de la banda de precipitación hasta el pocillo de partida del antígeno.

D, distancia recorrida por el dextrano desde el pocillo correspondiente hasta su nueva posición.

sobre la composición de los inmunoprecipitados.

#### IV.G.1. Tinción de glicoproteínas.

Seleccionamos el método de NADI (alfa-naftol dimetil p-fenilendiamina), por la sencillez y eficacia de la técnica.

##### IV.G.1.a. Reactivos.

1.- Ácido periódico al 1% en tampón de acetato de sodio 0,2 M.

2.- Clorhidrato de hidroxilamina al 10% en tampón de ácido acético - acetato sódico 0,2 M. (pH 4,3).

3.- Solución de alfa-naftol 0,01 M. (144 mg. de alfa-naftol en 100 ml. de solución  $10^{-4}$  M. de ácido etilendiaminotetraacético o EDTA, que se prepara disolviendo 2,9 mg. de ácido Titriplex II en 100 ml. de agua destilada, ajustando el pH a 6,1-7,0 con NaOH).

4.- Solución de p-fenilendiamina 0,01 M. (216 mg. en 200 ml. de EDTA).

5.- Agua oxigenada 0,1 M.

6.- Solución NADI (10 ml. de reactivo 3; 10 ml. de reactivo 4; 2 ml. de reactivo 5).

##### IV.G.1.b. Técnica.

Los portaobjetos, una vez desecados, se intro-

ducen en la solución de clorhidrato de hidroxilamina durante quince minutos. A continuación, se lavan en agua corriente otros quince minutos. Se sumergen en solución de ácido periódico diez minutos y, seguidamente, en solución NADI durante otros diez minutos. Por último, se lavan en agua destilada diez minutos.

Los protaobjetos se secan, bajo papel de filtro, en estufa a 37°C..

#### IV.G.2. Tinción de lipoproteínas.

Empleamos para ello el método del Sudán Negro.

##### IV.G.2.a. Reactivos.

1.- Solución saturada de Sudán Negro (1 g. en metanol al 60%). Se mantiene en agitación a 37°C., durante 16 24 horas y, después de enfriar, se filtra.

2.- Etanol al 50%.

##### IV.G.2.b. Técnica.

Las placas se sumergían durante dos horas en la solución de Sudán Negro, procurando que no se produzca evaporación. A continuación, se lavaban dos veces, durante quince minutos, en etanol al 50% y se secaban en estufa a 37°C.

IV.H. HEMAGLUTINACION PASIVA, SEGUN LA TECNICA DE LEWIS,  
(1.961).

Este método permite efectuar la reacción con hemáties tanizados, consiguiéndose así, estandarizar la prueba y sensibilizar, de forma óptima, los glóbulos rojos con la solución antigénica.

IV.H.1. Reactivos.

a.- Hemáties de carnero en solución Ansolver al 80% (0,55 g. de ácido cítrico 1 H<sub>2</sub>O; 20,50 g. de glucosa anhidra; 8 g. de citrato de sodio 5 H<sub>2</sub>O; 4,2 g. de cloruro sódico; 1.000 ml. de agua destilada).

b.- Suero fisiológico al 0,85%.

c.- Fosfato disódico 0,15 M.

d.- Fosfato monopotásico 0,15 M.

e.- Tampón pH 7,2 (un volumen de reactivo d y tres volúmenes de reactivo c).

f.- Tampón pH 6,4 ( un volumen de reactivo c y tres volúmenes de reactivo d).

g.- Tampón pH 7,2 con 0,6% de suero de conejo normal inactivado a 56°C., durante treinta minutos.

IV.H.2. Lavado de los hemáties.

Los hemáties de carnero en solución Ansolver al 80% se conservaban en el refrigerador a 4°C.. Si se ob-

servaba una buena sedimentación se utilizaban a partir del día siguiente.

Se tomaban 0,5 ml. de hematíes y se lavaban cinco veces, en 9,5 ml. de tampón pH 7,2, mediante centrifugaciones sucesivas. A continuación, se centrifugaba nuevamente a 1.000 r.p.m., durante cinco minutos y se decantaba el sobrenadante. Por último, los hematíes se resuspendían en 2 ml. de tampón pH 7,2 y, de este modo, quedaban preparados para la siguiente operación.

#### IV.H.3. Tanización.

Se emplearon dos soluciones de ácido tánico 1/30.000 y 1/40.000, en tampón pH 7,2.

La suspensión de hematíes y la dilución de ácido tánico se enfriaron, en baño de hielo a 2°C., durante cinco minutos.

A 3 ml. de la suspensión de hematíes se añadían 3 ml. de la solución de ácido tánico fría. Una vez mezclados, se dejaba en baño de hielo durante quince minutos, agitando suavemente cada cinco minutos.

Finalizada la tanización, se centrifugaba a 1.000 r.p.m. durante siete minutos. El sobrenadante se decantaba y el sedimento de cada tubo se lavaba con 10 ml. de tampón pH 7,2 enfriado a 2°C.

Después de una última centrifugación, igual a la anterior, se efectuaba la resuspensión final en 3 ml. de suero fisiológico.

#### IV.H.4. Sensibilización.

El extracto antigénico liofilizado se diluía al 1/5, 1/10 y 1/20 en tampón pH 6,4. A continuación, se añadían 3 ml. del extracto antigénico diluido, en cada tubo de hematies tanizados y se incubaban, en baño maría, a 37°C. durante treinta minutos, agitando cada cinco minutos. Después, se centrifugaba a 1.000 r.p.m. durante siete minutos y, el sedimento se lavaba dos veces en tampón pH 7,2 con 0,6% de suero de conejo normal inactivado. Por último, se resuspendían en 3 ml. de tampón pH 7,2 con 0,6% de suero de conejo normal inactivado.

#### IV.H.5. Reacción.

Se efectuaban diluciones progresivas de los inmunosueros problemas, en tampón pH 7,2 con 0,6% de suero de conejo normal inactivado, en placas Perspex.

Se añadían en cada excavación una o dos gotas de hematies sensibilizados y se agitaba. A los diez minutos se repetía la agitación y se dejaban a la temperatura ambiente. Se procedía a la lectura a las 4 y 24 horas.

#### IV.H.6. Lectura.

Se consideraba patrón de positividad (+), cuando el sedimento era abierto y ocupaba todo el fondo de la excavación, o bien, cuando se iniciaba un reborde, pero seguía ocupando la mayor parte de la excavación.

Patrón dudoso ( $\mp$ ), cuando se apreciaba una imagen de anillo abierto o cerrado.

Patrón negativo (-), cuando se formaba un sedimento o botón compacto en el fondo de la excavación.

#### IV.H.7. Controles.

Se incluía un suero control negativo que debía mantener su negatividad en la prueba, para que ésta se considerara como válida.



8261

## RESULTADOS Y DISCUSION

## CAPITULO V.

### RESULTADOS Y DISCUSION.

#### V.A. TITULOS DE PRECIPITINAS ALCANZADOS EN EL PROCESO DE HIPERINMUNIZACION, EFECTUADO EN CONEJOS, POR INOCULACION PARENTERAL DE LOS DIVERSOS EXTRACTOS ANTIGENICOS.

De acuerdo con la tabla II y, como era de esperar, en ninguno de los quince conejos utilizados se detectaron precipitinas o reacciones antígeno-anticuerpo inespecíficas frente a los diversos extractos antigénicos. En consecuencia, todos los animales se consideraron aptos para iniciar el proceso de hiperinmunización, al ser negativas todas las pruebas de precipitación realizadas a partir de la sangre inicial  $S_0$ .

Es conocido el hecho de que, el período de latencia o inducción, después de cada inyección, durante el cual no es posible detectar o determinar incrementos de anticuerpos en la sangre circulante, varía desde algunas horas a varios días (Carpenter, 1.975). Estas diferencias dependen, del tipo de antígeno utilizado, de la especie animal inoculada y de la vía de administración (Proom, 1.943). Para Kaminski (1.957), también influye la adición de adyuvantes al extracto antigénico.

El adyuvante de Freund, ya sea completo o incompleto, incrementa la inflamación local y, en consecuencia la proporción de macrófagos. Este fenómeno es previo al incremento de linfocitos que serían los principales

TABLA II

Títulos de precipitinas, alcanzados a los largo del proceso de hiperinmunización en el conejo, frente a los diversos extractos antigénicos inoculados, por precipitación en tubo capilar, según Swift-Wilson-Lancefield.

Sangrías parciales.	Recíproco del título de precipitinas				
	PSC	PSPD	PSP	PSCA	PSB
S <sub>0</sub>	0	0	0	0	0
S <sub>1</sub>	1.024	1.024	512	512	256
S <sub>2</sub>	4.096	2.048	1.024	1.024	512
S <sub>3</sub>	4.096	4.096	2.048	1.024	1.024
S <sub>F</sub>	8.192	4.096	2.048	1.024	1.024

S<sub>0</sub>: Sangría parcial antes de la 1ª inoculación.

S<sub>1</sub>: Sangría parcial antes de la 4ª inoculación.

S<sub>2</sub>: Sangría parcial antes de la 8ª inoculación.

S<sub>3</sub>: Sangría parcial antes de la 12ª inoculación.

S<sub>F</sub>: Sangría final, después de la 15ª inoculación.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

productores de anticuerpos naturales.

Para Dawe y col., (1.965), podría formularse la hipótesis de que la respuesta orgánica a la presencia de adyuvante sería de naturaleza secundaria. El aumento de la concentración de los anticuerpos naturales se debería a:

- a) La rápida proliferación de las células linfoides que producirían más anticuerpos naturales.
- b) La liberación y paso de este tipo de anticuerpos a la circulación general, por destrucción de las células linfoides o modificación de su permeabilidad.

Svet-Moldavsky y Raffkina (1.963), han demostrado que al inocular ratas con adyuvante de Freund se produce un incremento de las células plasmáticas de los nódulos linfoides. De acuerdo con esta hipótesis, sería posible la transferencia pasiva del efecto del adyuvante, al inocular un nuevo animal con un extracto antigénico unido al suero obtenido de ratas inoculadas únicamente con adyuvante.

Por otro lado, Humphrey (1.963), señala el hecho de que en conejos inyectados con adyuvante de Freund, se producía un aumento de la concentración de gammaglobulinas circulantes.

El empleo de adyuvante completo de Freund es recomendable, además de por las acciones celulares y humorales descritas, por el incremento del nivel de inmunización, especialmente cuando la concentración de proteína de extracto antigénico es inferior al 5% (p/v) (Clausen, 1.969).

Finalmente, dado el objeto de nuestro trabajo, consideramos muy positivamente la utilización de adyuvante completo, ya que según Kabat y Mayer (1.961), aumenta la antigenicidad de los componentes menores, así como da lugar a la posible detección de un mayor número de reacciones cruzadas (Dawe y col., 1.965).

En las condiciones experimentales de nuestro trabajo, conseguimos un título de 1/1.024, a los doce días, en el caso de los extractos antigénicos PSC y PSPO; a los veintiocho días para PSP y PSCA y, necesitamos prolongar el período de hiperinmunización a cuarenta y ocho días para el extracto antigénico PSB.

La sangría final ( $S_F$ ) y, por lo tanto, la recogida de los inmunosueros, que se emplearon para este trabajo, se efectuó, en todos los casos, a los sesenta y dos días de la primera inoculación. No obstante, el proceso de hiperinmunización fué más eficaz con el extracto antigénico PSC, mientras que con los antígenos PSCA y PSB, la respuesta de anticuerpos fué más débil (tabla II).

Creemos que estas diferencias dependen de las características especiales de cada extracto antigénico y de las variaciones individuales de los animales utilizados para el proceso de hiperinmunización. En este sentido, nuestros resultados están de acuerdo con Dray (1.960) que, afirma que, las similitudes antigénicas entre diferentes especies pueden dar lugar a fenómenos de inmunotolerancia hacia algunos antígenos, que producirían una respuesta insuficiente.

Hemos elegido el método de precipitación en

tubo capilar, para controlar los niveles de anticuerpos, a pesar de que se trata de una técnica de escasa sensibilidad (Carpenter, 1.975), por dos razones fundamentales:

- a) La metodología a emplear en el análisis de los extractos antigénicos (immunodifusión doble, immunodifusión radial e inmunoelectroforesis), se basa en la propia reacción de precipitación.
- b) Se trata de determinar, niveles de anticuerpos en sueros obtenidos por hiperinmunización y, en consecuencia, incluso la técnica de precipitación puede tener sensibilidad suficiente para ello.

V.B. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS EN GEL DE POLIACRILAMIDA  
CORRESPONDIENTES A LOS DIVERSOS EXTRACTOS ANTIGENICOS.

En las tablas III y IV se puede comprobar que el número de bandas diferenciadas de los diversos extractos antigénicos varía entre diez y trece. Ramdass y Misra (1.974) empleando preparados solubles de carne de diferentes especies obtienen electroferogramas, en gel de poliacrilamida al 7%, con un número de bandas que oscilan entre diez y dieciseis y, que no presentan diferencias significativas con nuestros resultados.

Las áreas correspondientes a los picos densitométricos (tabla III), varían muy notablemente en algunos casos, por lo que consideramos de interés, no sólo transformarlas en valores densitométricos porcentuales (tabla IV), sino también, ordenarlas de acuerdo con su importancia.

TABLA III

Valores densitométricos absolutos de los electroferogramas, obtenidos en gel de poliacrilamida, correspondientes a los diversos extractos antigénicos analizados.

Número de la banda.	PSC	PSP	PSB	PSCA	PSPD
1	125	8	65	18	67,5
2	27	6,7	45	7,5	1,7
3	23,5	1,5	20	3,1	42
4	22,5	6	49	67,5	6
5	105	56	84	32,5	124
6	360	63,3	350	168,7	323
7	344	306	101,2	39	315
8	207,5	49,5	6	14	12
9	412,5	56	97,7	7	28
10	13,5	4,2	24,7	225	146,2
11	30	3	144	496	
12	520	42	369,3		
13	553,5	506,2			
Totales:	2.915,3	1.108,4	1.355,9	1.078,3	1.065,4

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSPD: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

TABLA IV

Valores densitométricos porcentuales de los electroferogramas, obtenidos en gel de poliacrilamida, correspondientes a los diversos extractos antigénicos analizados.

Número de la banda.	PSC	PSP	PSB	PSCA	PSPD
1	4,28	0,72	4,79	1,66	13,72
2	0,92	0,60	3,31	0,69	2,62
3	0,79	0,13	1,47	0,28	1,12
4	0,77	0,54	3,61	6,25	29,56
5	3,60	5,05	6,19	3,01	30,31
6	12,34	5,71	25,81	15,64	19,63
7	11,79	27,60	7,46	3,61	0,56
8	7,11	4,46	0,44	1,29	3,94
9	14,14	5,05	7,20	0,64	0,15
10	4,63	0,38	1,82	20,86	6,33
11	2,74	0,27	10,62	45,99	
12	17,83	3,78	27,23		
13	18,98	45,66			
Totales:	<u>99,99</u>	<u>99,99</u>	<u>99,99</u>	<u>99,99</u>	<u>99,99</u>

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.



Ya que la electroforesis simple tiene, como objetivo final, diferenciar las bandas o componentes mayores de los menores, además de, determinar su movilidad electroforética, en la tabla V, se efectúa una clasificación densitométrica de las mismas. Es indudable que las bandas mayores tienen más posibilidades de contribuir a resolver el problema de la diferenciación de especies cárnicas, especialmente si, además, son específicas. Pensamos que las bandas menores y, sobre todo, las que presentan un valor densitométrico porcentual inferior al 5%, no jugarían ningún papel en este sentido, independientemente de su carácter específico o de que se trate de una banda común, compartida con extractos antigénicos de otra especie.

Por otra parte, creemos de interés considerar, que los valores densitométricos de estas bandas, también pueden variar en función de los diferentes colorantes que se utilicen para su tinción. Así ocurre, con los extractos de proteínas sarcoplásmicas de músculo de cerdo tratadas con negro amida y benzidina (Charpentier y Goutefongea, 1.963). En otros casos, las diferencias densitométricas dependen de la especie animal con que se ha preparado el extracto antigénico. Coduri y Rand (1.972), han demostrado que, los componentes mayores de proteínas, procedentes del caballo, se tiñen con más intensidad que las de extractos cárnicos de otras especies animales.

El extracto antigénico PSC presenta trece bandas electroforéticas (figuras 6 y 3), mientras que otros autores citan de catorce a dieciseis (Ramdass y Misra, 1.974

TABLA V

Clasificación densitométrica de las bandas detectadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, correspondientes a los diversos extractos antigénicos analizados.

Extracto antigénico.	Porcentaje del valor densitométrico				
	<5%	Entre 5-12%	Entre 12-25%	Entre 25-40%	>40%
PSC	7	2	4	0	0
PSP	8	3	0	1	1
PSB	6	4	0	2	0
PSCA	7	1	2	0	1
PSPD	5	2	1	2	0

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

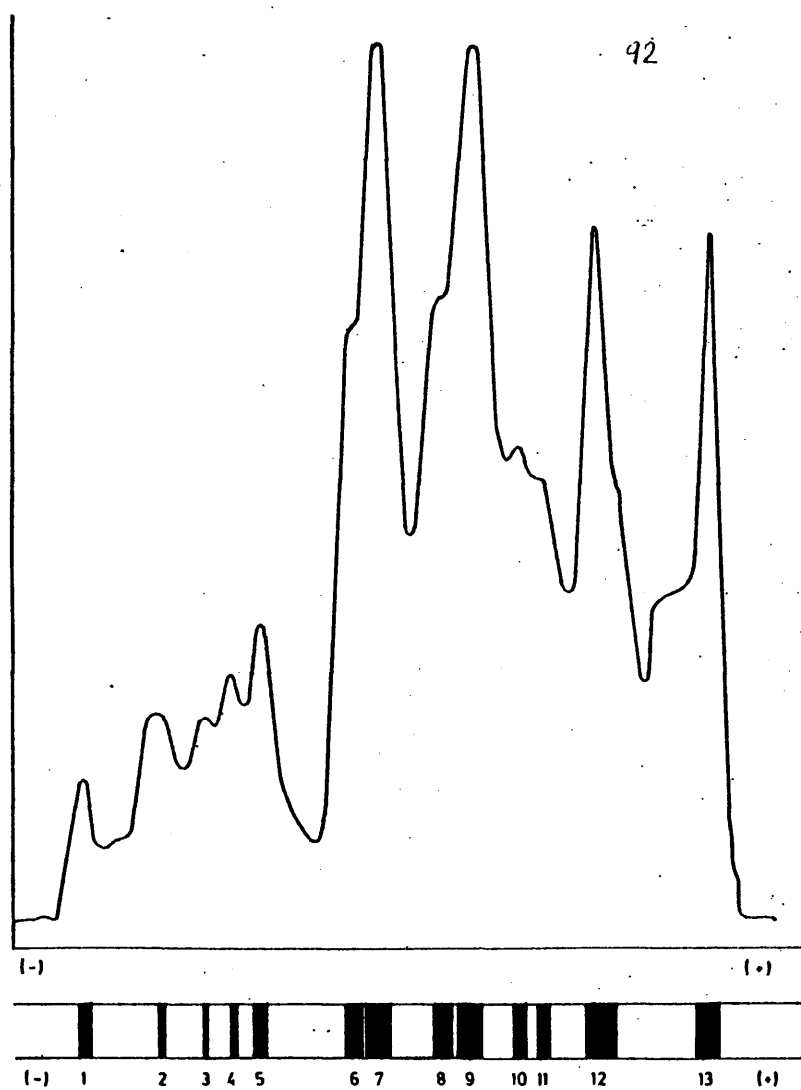


FIG. 6.- Trazado densitométrico y diagrama de la electroforesis en gel de poliacrilamida, correspondiente al extracto antigénico de proteína soluble de carne de cerdo (PSC).

Charpentier y Goutefongea, 1.963). No obstante, consideramos más importante, el hecho de que el cerdo no presente bandas con valores densitométricos superiores al 25%. La diferenciación de extractos cárnicos, por métodos de base inmunológica estaría, además, dificultada en esta especie, por la localización de cinco de los componentes protéicos en una zona relativamente corta y, por lo tanto, con movi- lidades muy cercanas (Champion y col., 1.970).

En nuestra experiencia encontramos, en los extractos porcinos, cuatro componentes con valores superiores al 5% y, cuyas movilidades electroforéticas están muy próximas.

De los trece componentes electroforéticos del PSP (figura 7), hay dos que, para nosotros tienen especial significado ya que, en un caso, el porcentaje del valor densitométrico está comprendido entre 25 y 40 y, en el otro, es superior a este nivel.

Ramdass y Misra (1.974), han diferenciado de doce a catorce bandas, cifra similar a la obtenida por nosotros. Para estos mismos investigadores, el electroferograma canino tendría dos componentes característicos que no aparecerían en extractos de otras especies. Estudiándolo comparativamente con el efectuado en este trabajo, consideramos que la banda número 12, cuya movilidad es algo superior a la de los dos componentes menores, podría corresponder a la banda característica de mayor movilidad, citada por estos autores.

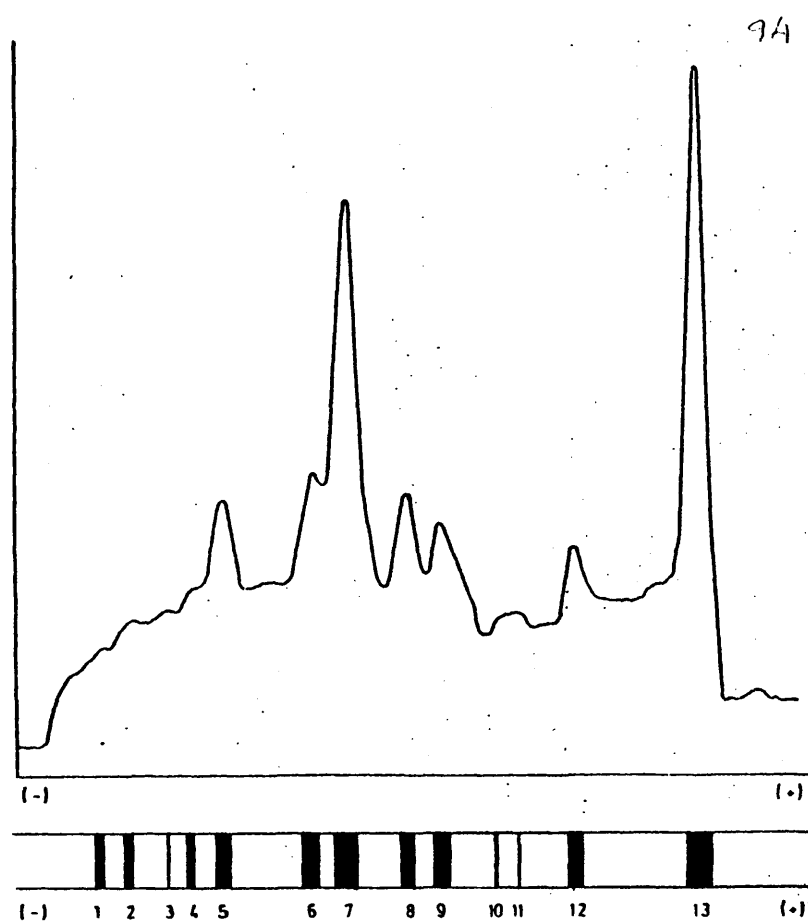


FIG. 7.- Trazado densitométrico y diagrama de la electroforesis en gel de poliacrilamida, correspondiente al extracto antigénico de proteína soluble de carne de perro (PSP).

El extracto antigénico PSE permitió diferenciar doce bandas, por electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 8), de las que sólo dos pueden considerarse componentes mayores, ya que presentan valores densitométricos comprendidos entre 25 y 40%.

Los trabajos consultados señalan un número de bandas, correspondientes a proteínas sarcoplásmicas de bóvidos, que oscila entre seis y veinticuatro (Deschreider y Meaux, 1.974; Petropakis y col., 1.969). Cuando el extracto cárnico era de tipo soluble y, la electroforesis se realizaba sobre gel de poliacrilamida al 7%, la cifra de componentes antigénicos variaba entre diez y dieciseis (Ramdass y Misra, 1.974).

El estudio del electroferograma de extracto de carne de vacuno permite diferenciar dos componentes (bandas números 11 y 12) de mayor movilidad, que pueden corresponderse con las bandas de localización anódica denominadas B<sub>10</sub> y B<sub>12</sub> por Ramdass y Misra (1.974).

Champion y col., (1.970), aíslan cuatro bandas mayores del músculo de buey y, de ellas; la de menor movilidad presenta una elevada concentración relativa, por lo que, sería la más fácilmente detectable por métodos inmunológicos. Esta banda, podría corresponderse con la identificada en nuestro trabajo, con el número 6 y, con un valor densitométrico porcentual, ligeramente superior a 25%.

En la tabla IV, observamos que, el número de componentes electroforéticos del extracto antigénico

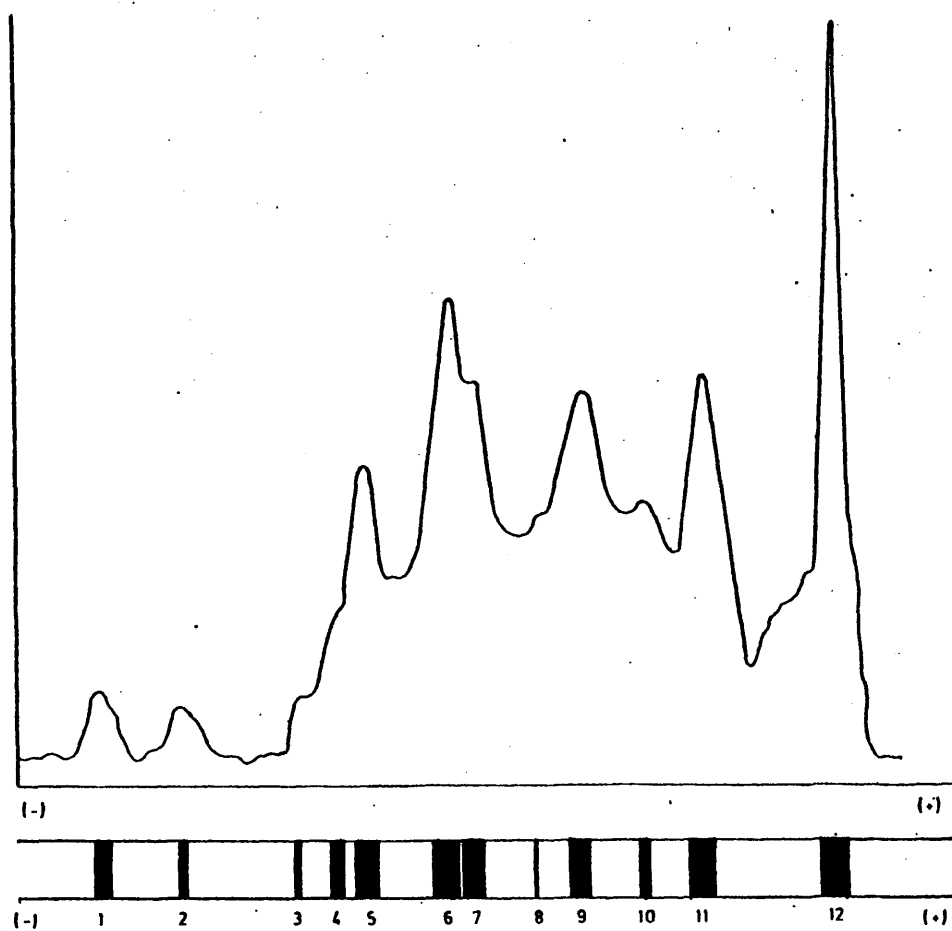


FIG. 8.- Trazado densitométrico y diagrama de la electroforesis en gel de poliacrilamida, correspondiente al extracto antigénico de proteína soluble de carne de vacuno (PSB).

PSCA es de once. Esta cifra es sensiblemente superior a las obtenidas por Deschreider y Meaux, (1.974), en extractos de proteínas sarcoplásmicas, procedentes del caballo. Es de destacar, en los electroferogramas de nuestra experiencia que, existe una fracción de mayor movilidad, cuya concentración o valor densitométrico es muy superior a las demás (banda número 11) y, que creemos, puede ser más significativa que las señaladas como específicas por Deschreider y Meaux (1.974), con las que indudablemente, no se corresponde (figura 9).

El extracto muscular de pollo (PSP0), da lugar a sólo diez bandas electroforéticas (figura 10 y 3), mientras que el número señalado por Ramdass y Misra (1.974) varía de catorce a dieciseis.

Hemos hallado dos componentes con valores densitométricos entre 25 y 40% que se corresponden con las bandas números 4 y 5. La característica más notable, en relación con este extracto antigénico, radica en el hecho de que, la fracción más anódica presenta menor movilidad en relación con los extractos de las demás especies domésticas estudiadas. La distribución de las bandas es homogénea y, en este sentido, nuestros resultados no concuerdan con los señalados por Ramdass y Misra (1.974), que consideran característico del pollo, la localización catódica de varias fracciones electroforéticas.

Consideramos muy problemático, poder comparar y, más aún, llegar a identificar, las bandas de los



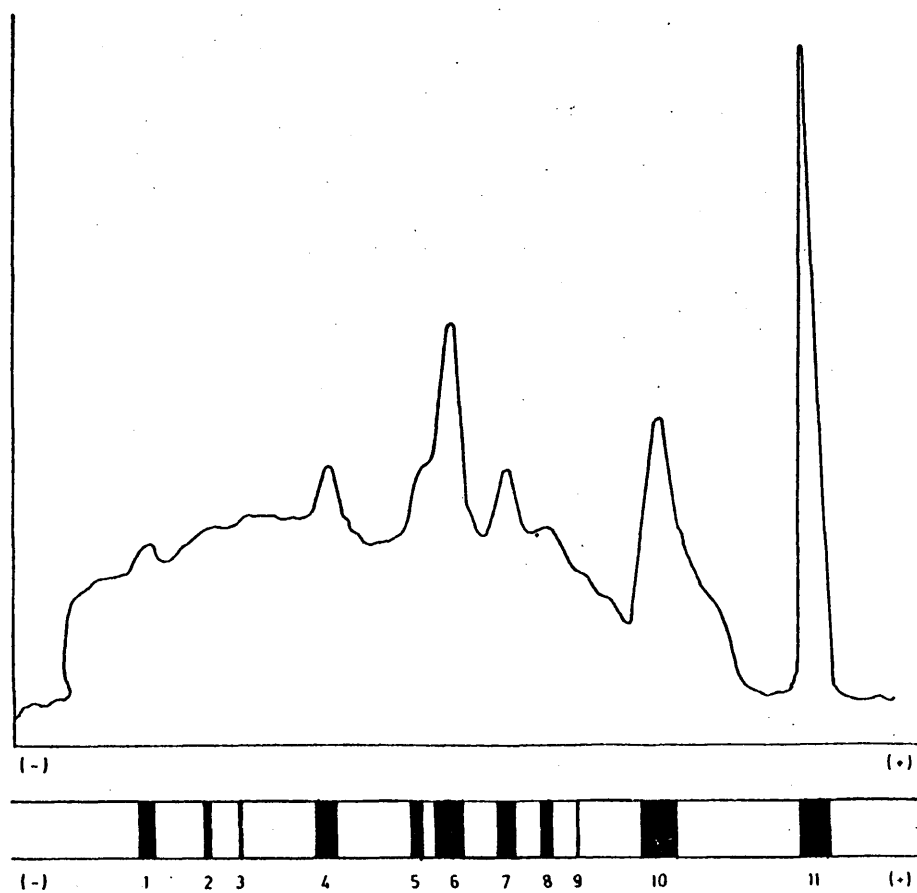


FIG. 9.- Trazado densitométrico y diagrama de la electroforesis en gel de poliacrilamida, correspondiente al extracto antigénico de proteína soluble de carne de caballo (PSCA).

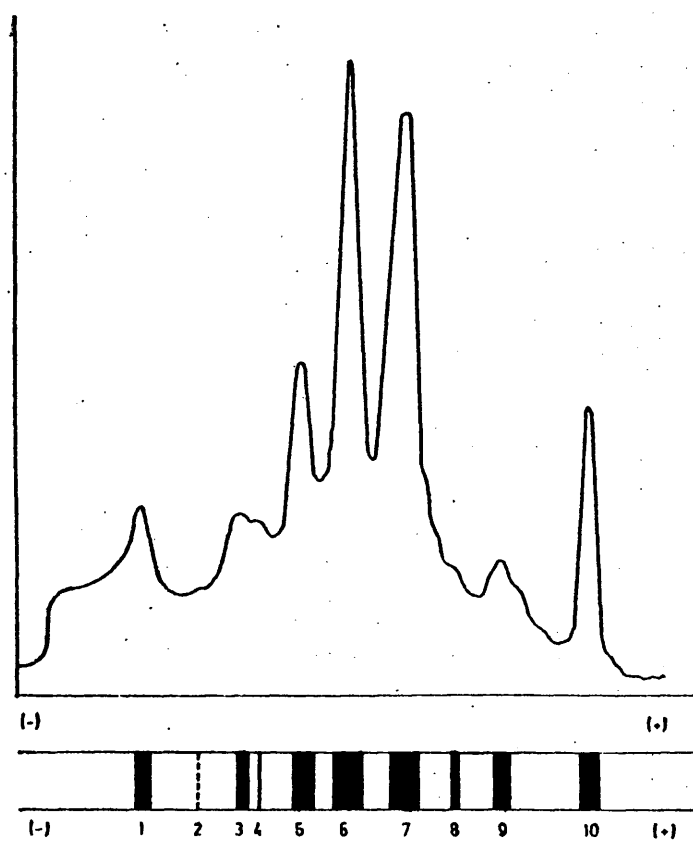


FIG. 10.- Trazado densitométrico y diagrama de la electroforesis en gel de poliacrilamida, correspondiente al extracto antigénico de proteína soluble de carne de pollo (PSPO).

diferentes extractos antigénicos en función exclusivamente de su movilidad, pues la variabilidad de la propia técnica, aún realizada en las mismas condiciones, representa un error estimable. Estas dificultades se incrementan, al intentar comparar los resultados obtenidos por diferentes autores que, en la mayor parte de los casos, utilizan modificaciones del método original. En consecuencia, hemos preferido basar el análisis de nuestros resultados, en la clasificación densitométrica de las bandas (tabla V), pues creemos que así enfocamos el problema con más objetividad.

V.C. COMPOSICION ANTIGENICA DE DIVERSOS EXTRACTOS SOLUBLES DE PROTEINAS MUSCULARES, FRENTE A INMUNOSUEROS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS, POR INMUNODIFUSION EN GEL DE AGAROSA, SEGUN OUCHTERLONY.

V.C.1. Sistemas homólogos.

V.C.1.a. Determinación de la concentración óptima de los extractos antigénicos a utilizar en las pruebas.

En la tabla VI se muestra el número de fracciones puestas de manifiesto en relación con la dilución ensayada de cada extracto antigénico. La dilución 1/2, que contenía 24 mg. de antígeno liofilizado por mililitro, era la óptima en todos los casos, ya que permitió detectar, el mayor número de fracciones y originó más nitidez en las líneas de precipitación.

De acuerdo con Clausen (1.969), para llegar

TABLA VI

Fracciones detectadas en diferentes diluciones de extractos antigénicos de carne, frente a los correspondientes inmunosueros homólogos, por la técnica de inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony.

Dilución	Extractos antigénicos				
	PSC	PSB	PSCA	PSPD	PSP
1/1	3	3	4	4	3
1/2	5	4	5	6	6
1/4	4	4	5	6	5
1/8	4	3	4	4	3
1/16	1	0	0	1	1

La dilución 1/1 se obtiene al disolver 48 mg. de polvo liofilizado, de cada extracto antigénico, en 1 ml. de agua destilada.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

a producir el máximo número de arcos de precipitación se debe determinar la relación óptima entre las concentraciones de antígeno y anticuerpo. Aunque se recomienda efectuar series con suero no diluido, frente a diversas concentraciones del antígeno y, otras, preparadas a base de soluciones de antígeno no diluidas frente a antisueros de diferentes concentraciones, en el presente trabajo sólo efectuamos el primer tipo de ensayo. Esta decisión se basa en que, si utilizáramos antisueros diluidos disminuiría, probablemente, la sensibilidad de la técnica, al mismo tiempo que, como señala Muñoz (1.971), la intensidad de la línea de precipitación depende, principalmente, de la concentración del antisuero.

Cuando el antígeno se encontraba escasamente diluido, no sólo disminuyó el número de fracciones sino que, además, se formaba un anillo o halo alrededor del pocillo que dificultaba la observación de los inmunoprecipitados.

Ouchterlony y Nikon (1.973), consideran que, un exceso en la concentración antigénica inhibe total o parcialmente la formación del precipitado e incrementa el tiempo necesario para completar la reacción. Sturani y col. (1.976) señalan, en este sentido, que la dilución adecuada del antígeno determina una línea de precipitación más o menos equidistante de ambos pocillos, al mismo tiempo que, al disminuir la concentración de la proteína no reaccionante, se elimina el anillo zonal que se formaba alrededor del pocillo.

V.C.1.b. Número de fracciones diferenciadas.

La eficacia del método de inmunodifusión se basa en el hecho de que, cada molécula de anticuerpo reconocería a su determinante antigénico correspondiente y, formaría así, una línea de precipitación que, representaría un sistema simple antígeno-anticuerpo (Buchanan-Davidson y Oudin, 1.958).

La ventaja del método radica no sólo en la localización del número mínimo de sistemas antígeno-anticuerpo reaccionantes, sino sobre todo, en el hecho de poder llegar a establecer las relaciones existentes entre varios antígenos (Kaminski y Nouvel, 1.953; Goodman, 1.962).

Según se observa en la tabla VII, el número de fracciones diferenciadas, en los diversos extractos antigénicos, varía de cuatro a seis componentes. Estos resultados no están influidos por el propio proceso de hiperinmunización, ya que los extractos antigénicos PSPO y PSP, que presentan seis fracciones por inmunodifusión, no consiguieron los niveles más elevados de precipitinas, al ser inoculados parenteralmente en el conejo (recíproco del título 4.096 y 2.048, respectivamente). Inversamente, el extracto PSC, que llega a títulos de 8.196, por precipitación en tubo capilar, sólo ha permitido la detección de cinco componentes, cuando se enfrentó al inmunosuero homólogo, en placa de Ouchterlony. Unicamente, en el caso del antígeno PSB, coincidió el número más bajo de fracciones con un nivel, también relativamente escaso de precipitinas, al final del período de inmunización.

TABLA VII

Fracciones detectadas en los diversos extractos antigénicos diluidos al 1/2 (24 mg./ml.), por la técnica de inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony, frente a los correspondientes inmunosueros homólogos, obtenidos por inoculación parenteral en el conejo.

Extractos antigénicos	Inmunosueros	Fracciones
PSC	anti-PSC	5
PSB	anti-PSB	4
PSCA	anti-PSCA	5
PSPD	anti-PSPD	6
PSP	anti-PSP	6

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

Estudiando globalmente estos resultados y, considerando que las pruebas se repitieron, en cada caso, al menos catorce veces, podemos concluir que, el número de componentes antigénicos aislados no depende del propio proceso de inmunización sino que, obedece a la presencia de fracciones, que pueden ser diferentes tanto en el aspecto cualitativo como en el cuantitativo.

Pero la técnica tiene, naturalmente, ciertas limitaciones, que es preciso conocer para valorar los resultados. Así, Garvey y col., (1.977), citan la imposibilidad de detectar anticuerpos no precipitantes y la dificultad de resolución cuando se emplean mezclas antigénicas complejas. Grabar, (1.958) señala que, el exceso de antígenos o anticuerpos puede hacer que una línea de precipitación se divida en varias. Paul y Benacerraf, (1.966), han demostrado que se puede formar una doble línea de precipitación al reaccionar un conjugado hapteno-proteína con el suero anti-hapteno específico.

Finalmente, pueden producirse anomalías en las líneas de precipitación por cambios bruscos de la temperatura de incubación (Crowle, 1.961; Ouchterlony, 1.962), defectos en los pocillos donde se depositan los reactivos, o por fenómenos de desnaturalización del extracto antigénico, durante la fase de emigración (Lapresle, 1.955; Ishizaka y col., 1.960).

Hemos tratado de luchar contra los inconvenientes reseñados, normalizando y repitiendo las pruebas, hasta obtener resultados constantes. En este sentido, se ha prestado especial atención a la temperatura de in-



cubación y, sobre todo, se han efectuado los ensayos previos, para conseguir las concentraciones relativas de antígenos y antisueros, que permitieran observar líneas de precipitación más fuertes y nítidas.

#### V.C.2. Sistemas heterólogos.

##### V.C.2.a. Determinación de la concentración óptima de los extractos antigénicos a utilizar en las pruebas.

En las tablas VIII, IX, X y XI, se puede comprobar que, la dilución óptima de los antígenos era de 1/1 para todos los sistemas de carácter heterólogo, excepto cuando las pruebas se realizaron contra el inmunosero anti-PSP, que dió mayor número de líneas de precipitación, con extractos antigénicos diluidos al 1/2. Estos resultados, comparados con los obtenidos en los sistemas homólogos, hacen pensar que, en general, para obtener buenas líneas de precipitación es necesaria una mayor concentración de antígeno, cuando se enfrenta a un antisero heterólogo.

Es conocido el hecho de que, para analizar sistemas heterólogos se precisan inmunoseros con elevado título de precipitinas. Ya que, los empleados en nuestra experiencia, eran los mismos tanto para las reacciones antígeno-anticuerpo homólogas como para las heterólogas, creemos que los determinantes antigénicos responsables de las líneas de precipitación comunes, reaccionarían más fuertemente con los lugares receptores de las moléculas de anti-

TABLA VIII

Fracciones detectadas en diferentes diluciones de los extractos antigénicos de carne, frente al inmunosero heterólogo anti-PSB, por inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony.

Dilución	Extractos antigénicos			
	PSCA	PSC	PSP	PSPD
1/1	2	1	0	0
1/2	1	1	0	0
1/4	1	0	0	0

La dilución 1/1 se obtiene al disolver 48 mg. de polvo liofilizado, de cada extracto antigénico, en 1 ml. de agua destilada.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

TABLA IX

Fracciones detectadas con diferentes diluciones de los extractos antigénicos de carne, frente al inmunosero heterólogo anti-PSCA, por inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony.

Dilución	Extractos antigénicos.			
	PSP	PSB	PSC	PSPD
1/1	1	2	2	0
1/2	0	2	1	0
1/4	0	0	1	0

La dilución 1/1 se obtiene al disolver 48 mg. de polvo liofilizado, de cada extracto antigénico, en 1 ml. de agua destilada.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

TABLA X

Fracciones detectadas en diferentes diluciones de los extractos antigénicos de carne, frente al inmunosero heterólogo anti-PSC, por inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony.

Dilución	Extractos antioénicos			
	PSB	PSCA	PSPD	PSP
1/1	2	3	2	4
1/2	2	2	2	4
1/4	1	0	1	1

La dilución 1/1 se obtiene al disolver 48 mg. de polvo liofilizado, de cada extracto antigénico, en 1 ml. de agua destilada.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

TABLA XI

Fracciones detectadas en diferentes diluciones de los extractos antigénicos de carne, frente al inmunosero heterólogo anti-PSP, por inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony.

Dilución	Extractos antioénicos			
	PBB	PSCA	PSC	PSPD
1/1	2	1	0	0
1/2	2	2	2	0
1/4	1	2	0	0

La dilución 1/1 se obtiene al disolver 48 mg. de polvo liofilizado, de cada extracto antigénico, en 1 ml. de agua destilada.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PBB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

cuerpo, al encontrarse en proporciones o concentraciones relativamente más elevadas.

V.C.2.b. Número de fracciones diferenciadas.

Los extractos antigénicos PSCA y PSC presentaban comunidades antigénicas con el PSB cuando se enfrentaban, por inmunodifusión, a un inmunosuero, obtenido por inoculación de éste último antígeno (tabla XII). Por otro lado, como se puede observar en la misma tabla, no se detectaron fracciones comunes con los extractos PSP y PSPO (figura 11).

En muchas ocasiones se han demostrado comunidades antigénicas entre proteínas séricas de diferentes especies animales. Bauer, (1.969), encuentra que, los extractos antigénicos de las diferentes especies animales dan reacciones heterólogas, por inmunodifusión en placa, en función casi siempre de su posición filogenética. Kaminski (1.957), considera la gammaglobulina de buey idéntica a la de cordero y, la humana igual a la del chimpancé. Así mismo, diferentes autores (Murakami y col., 1.969; Soetarto, 1.964), han evidenciado comunidades antigénicas no sólo entre las proteínas musculares y proteínas séricas, sino también, entre las proteínas musculares de diversas especies. Estos trabajos, no han aclarado si las proteínas musculares tienen un antígeno común con las del suero o bien, si existiría una fracción protéica sérica retenida por el músculo. Katsube e Imaizumi (1.966) sugieren que,



TABLA XII

Fracciones detectadas en los diversos extractos antigénicos heterólogos, por la técnica de inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony, frente al inmunosero anti-PSB, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

Extractos antigénicos heterólogos.	Fracciones	
	Comunes	Idénticas
PSCA	2	0
PSC	1	0
PSP	0	0
PSP0	0	0

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSP0: Proteína soluble de carne de pollo.

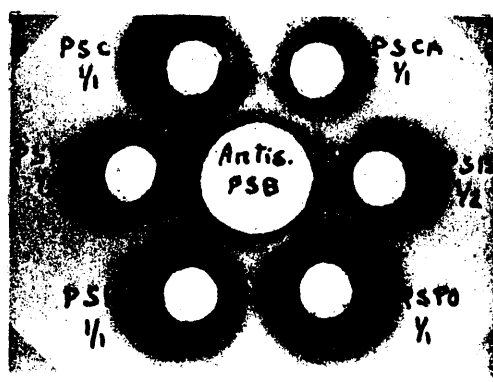
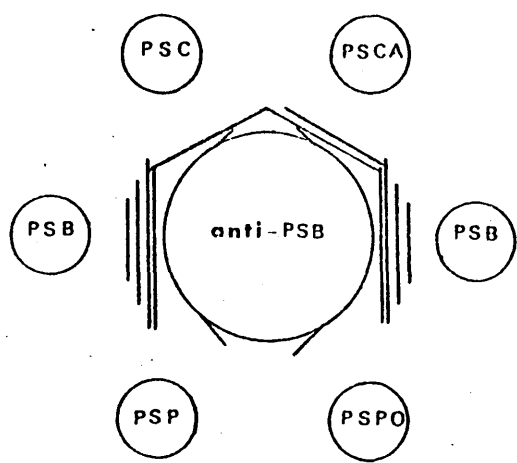


FIG. 11.- Esquema y reproducción fotográfica de la inmunodifusión en gel de agarosa (pH.8,6) , según la técnica de Ouchterlony, realizada con diversos extractos antigénicos frente al inmunosero anti-PSB, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.



esta fracción puede ser uno de los factores antigénicos más importantes, relacionados con la aplicación de la reacción de precipitación a la diferenciación de carnes. Desde un punto de vista práctico, son muchos los investigadores que, para diferenciar tejidos musculares de diversas especies, emplean inmunosueros de conejo obtenidos por inoculación de proteínas séricas (Tammenag, 1.954; Weinstock, 1.953).

En nuestro trabajo, hemos encontrado dos fracciones antigénicas comunes entre el extracto antigénico soluble de caballo y el inmunosero anti-PSB, mientras que Rangel (1.965), demuestra que hay comunidad entre la seroalbúmina bovina y equina. Si alguno de los componentes detectados por nosotros fuese la citada seroalbúmina, podríamos admitir la existencia de comunidad entre la procedente del caballo y del buey, pero no, la presentación de reacciones de identidad inmunológicas, demostrables por inmunodifusión en placa.

Finalmente, queremos destacar que, no se ha detectado ninguna fracción idéntica con los extractos heterólogos ensayados. De esta forma, nuestro trabajo demuestra que, la reacción de precipitación en gel de agarosa presenta mayor especificidad que la reacción en tubo, ya que, en este último caso, aparecerían falsas reacciones positivas (debidas a las fracciones comunes observadas frente a PSCA y PSC) que, naturalmente, se detectarían y rechazarían al efectuar la reacción sobre gel, y no dar reacciones de identidad.

El inmunosuero anti-PSCA permitió la detección de fracciones antigénicas comunes e, incluso idénticas, con todos los extractos de proteínas solubles de mamíferos ensayados (figura 12), mientras que, no se observaron líneas de precipitación con el preparado antigénico de carne de pollo (PSPO) (tabla XIII).

Ya hemos citado el hallazgo de dos fracciones comunes entre el PSCA y el inmunosuero anti-PSB, que podrían ser las mismas que se recogen en la tabla XIII de componentes heterólogos, frente al inmunosuero anti-PSCA.

Entre el inmunosuero anti-PSCA y el extracto soluble de carne de cerdo (PSC), hallamos dos fracciones comunes y, de ellas, una era idéntica. Cuando se enfrentó al extracto de carne de perro (PSP), únicamente se diferenció una fracción que, no sólo era común, sino también idéntica.

Diversos autores han demostrado la comunidad antigénica entre proteínas séricas del caballo, buey, cerdo, cordero, e incluso del hombre (Kaminski, 1.957). Por otra parte, los extractos solubles, procedentes de distintos tejidos musculares de las especies domésticas, contienen diferentes proteínas séricas, por lo que es perfectamente explicable, la puesta en evidencia de estas comunidades.

Dentro de las condiciones de nuestra experiencia, no hemos observado comunidades antigénicas entre el inmunosuero anti-PSCA y el extracto de carne de pollo. En este caso, se puede pensar que, los componentes antigénicos comunes disminuyen o desaparecen cuando las es-

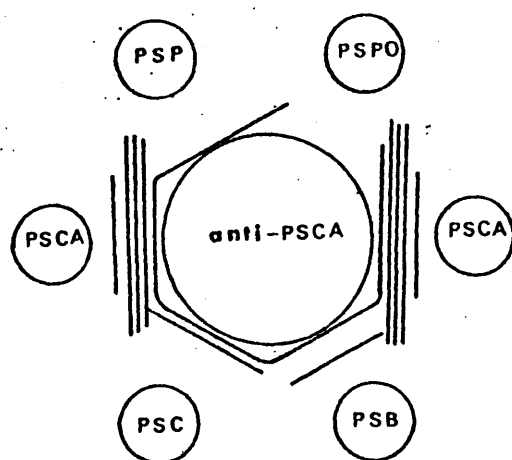


FIG. 12.- Esquema y reproducción fotográfica de la inmunodifusión en gel de agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony, realizada con diversos extractos anti-génicos frente al inmunosero anti-PSCA, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

TABLA XIII

Fracciones detectadas en los diversos extractos antigénicos heterólogos, por la técnica de inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony, frente al inmunosero anti- PSCA, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

Extractos antigénicos heterólogos.	Fracciones	
	Comunes	Idénticas
PSB	2	1
PSC	2	1
PSP	1	1
PSPD	0	0

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

pecies animales están más alejadas, desde el punto de vista taxonómico (Bordet, 1.899).

Por otra parte, la presencia de reacciones cruzadas puede no corresponder totalmente a una especificidad de especie, sino a una comunidad de estructuras de una categoría de proteínas (Kaminski, 1.957).

Como se señala en la tabla XIV, el inmuno-suero anti-PSC es el que ha permitido observar más fracciones comunes e idénticas con los extractos antigénicos heterólogos (figura 13).

En este sentido, otros investigadores han llegado a resultados similares, hallando componentes comunes con extractos cárnicos de vaca y caballo (Soetarjo 1.964). Para nosotros tiene más importancia el hecho de detectar comunidades e identidades con perro y pollo.

No hemos encontrado referencias bibliográficas concretas que nos expliquen o confirmen los resultados obtenidos frente a estos extractos cárnicos, pero indudablemente, creemos que, el elevado número de líneas de precipitación conseguidas se debe, en parte, al fuerte título de precipitinas obtenido en el conejo, por inoculación de este antígeno. Warnecke y Saffle (1.968), apoyan esta idea al considerar que, el antisuero de cerdo es muy específico inicialmente, pero que, después de un proceso de hiperinmunización de noventa días, aumentan las reacciones cruzadas con otras especies. En nuestro trabajo, la sangría final se efectuó después de quince inyecciones por vía parenteral y a los sesenta y dos días de la pri-

TABLA XIV

Fracciones detectadas en los diversos extractos antigénicos heterólogos, por la técnica de inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony, frente al suero anti-PSC, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

Extractos antigénicos heterólogos.	Fracciones	
	Comunes	Idénticas
PSB	2	2
PSCA	3	2
PSPD	2	1
PSP	4	2

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

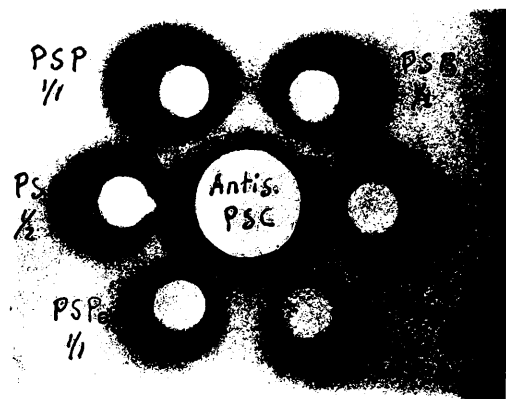
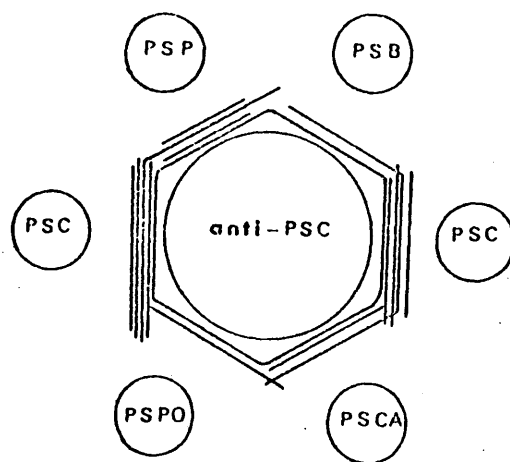


FIG. 13.- Esquema y reproducción fotográfica de la inmunodifusión en gel de agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony, realizada con diversos extractos anti-génicos frente al inmunosuero anti-PSC, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

mera inoculación y, como también afirma Proom (1.943), el incremento del número de inoculaciones hace decrecer la especificidad del inunosuero y, en consecuencia, aumentan las reacciones cruzadas con otras especies.

Los extractos antigénicos de proteínas musculares de bóvido, caballo y cerdo reaccionaron positivamente frente al inunosuero anti-PSP, apreciándose frente al extracto porcino, una línea de identidad (figura 14). Cuando el antígeno procedía de carne de pollo, no apareció ninguna línea de precipitación (tabla XV).

En la bibliografía consultada, hemos encontrado pocos datos que hagan referencia al perro. Solamente Kaminski (1.957) cita la presencia de una reacción cruzada, muy marcada, entre la albúmina canina y las de cordero y conejo.

Los razonamientos expuestos con anterioridad en relación con el procedimiento o pauta de inmunización, la contaminación de los extractos solubles cárnicos con proteínas séricas y la posible presencia de reacciones cruzadas que obedecen más bien a una analogía estructural de la molécula que a una verdadera especificidad debida a la especie animal, podrían también ser argumentos a esgrimir, ante estos resultados.

Cuando las placas de inmunodifusión de Ouchterlony se prepararon con el inunosuero de conejo, obtenido por inoculación del extracto cárnico de pollo, no se pudo observar ninguna línea de precipitación, frente a los



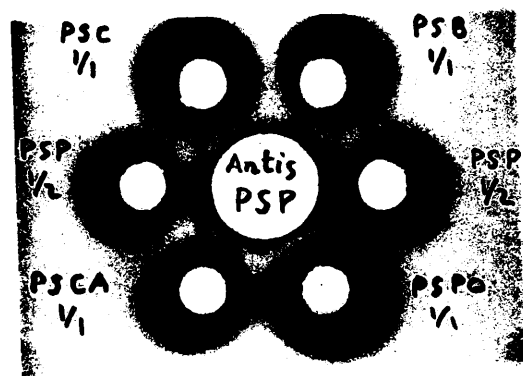
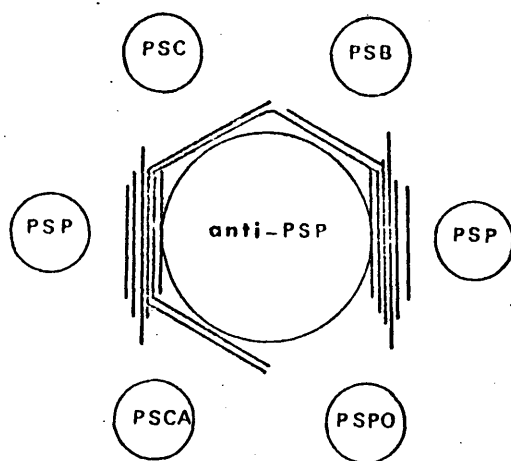


FIG. 14.- Esquema y reproducción fotográfica de la inmunodifusión en gel de agarosa (pH 8,6) según Ouchterlony, realizada con diversos extractos anti-génicos frente al inmunosuero anti-PSP, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

TABLA XV

Fracciones detectadas en los diversos extractos antigénicos heterólogos, por la técnica de inmunodifusión en agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony, frente al inmunosero anti-PSP, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

Extractos antigénicos heterólogos.	Fracciones	
	Comunes	Idénticas
PSB	2	0
PSCA	2	0
PSC	2	1
PSP0	0	0

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSP0: Proteína soluble de carne de pollo.

distintos antígenos heterólogos (figura 15). No obstante, entre pollo y cerdo, la reacción resultó positiva cuando se empleó el inmunosuero anti-PSC.

Estos resultados no coincidentes, pueden explicarse por los diferentes títulos de inmunización conseguidos en el conejo, al utilizar los antígenos procedentes de cerdo y pollo.

Ohtsuki (1.975) señala que, la troponina de músculo de pollo presenta múltiples lugares o zonas antigénicas y sólo evidencia reacción positiva, cuando el inmunosuero correspondiente, se sitúa frente a carne de pollo cruda o calentada a 70°C.. En todos los casos es negativa cuando la suspensión antigénica, tratada también térmicamente, procede de carne bovina, porcina u ovina. En nuestros experimentos, no hemos sometido los extractos musculares a la acción del calor y, además, trabajamos con proteínas solubles, por lo que la analogía de los resultados, por precipitación en gel, tienen únicamente un valor relativo.

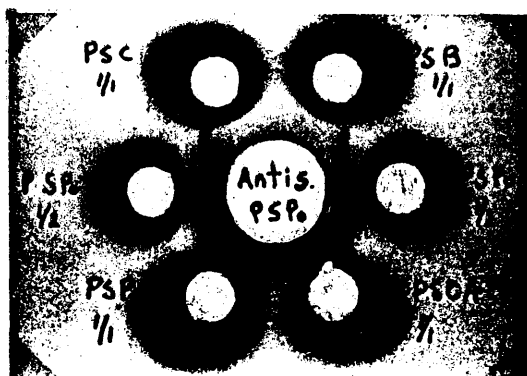
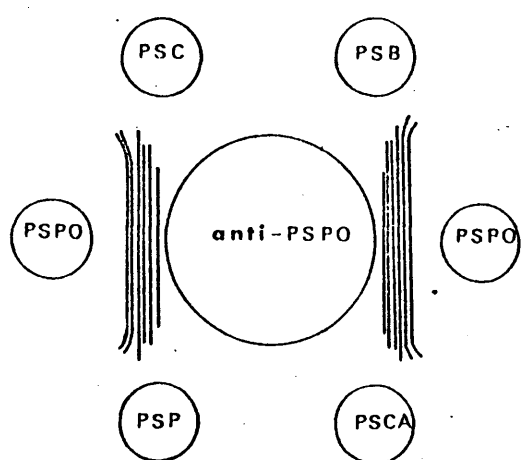


FIG. 15.- Esquema y reproducción fotográfica de la inmunodifusión en gel de agarosa (pH 8,6), según Ouchterlony, realizada con diversos extractos anti-génicos frente al inmunosuero anti-PSPO, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

V.D. EXTRACTOS SOLUBLES DE PROTEINAS MUSCULARES FRENTE A INMUNOSUEROS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS, POR INMUNODIFUSION RADIAL EN AGAROSA (PH 8,6), SEGUN MAICINI.

V.D.1. Sistemas homólogos.

V.D.1.a. Determinación de las concentraciones óptimas de los extractos antigénicos y de los inmunosueros a utilizar en las pruebas.

Como se observa en las tablas XVI, XVII, XVIII, XIX y XX, las áreas mayores de los halos de precipitación corresponden siempre a las pruebas realizadas con más concentración de antígeno y menos de inmunosuero. Así, en el sistema PSB anti-PSB, la superficie medida es de 72,3 ( $\pm 0,21$ ), en PSCA anti-PSCA de 88,2 ( $\pm 0,16$ ), en PSC anti-PSC de 95,0 ( $\pm 0,51$ ), en PSP anti-PSP de 153,9 ( $\pm 0,92$ ) y, finalmente en PSPO anti-PSPO de 109,3 ( $\pm 0,16$ ) mm<sup>2</sup>. Elegimos los valores máximos de las tablas, dentro de las diversas concentraciones ensayadas, con el fin de que, al estudiar más adelante los sistemas heterólogos, tuviéramos un amplio margen para comparar significativamente los resultados y, en consecuencia, valorar la presencia de comunidades antigénicas más o menos estrechas.

Teóricamente podíamos haber elegido concentraciones incluso más elevadas de antígeno y más diluidas de antisueros pero, como tuvimos ocasión de comprobar experimentalmente y señala Heremans, (1.971), la intensidad del halo de precipitación decrece en proporción a la dilución del antisuero. Esta circunstancia se traduce en la

TABLA XVI

Ecuaciones de las rectas de regresión, en relación con las diferentes concentraciones del inmunosuero anti-PSB, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.

Porcentaje inmunosuero anti-PSB en agarosa.	Extracto antigénico PSB (mq. proteína/ml.)		
168,1	84,0	42,0	21,1 S = S <sub>0</sub> + K. C <sub>ag</sub> .
9,23	51,5(±0,87)	25,0(±0,53)	16,6(±0,44) 14,5(±0,15) S = 6,55 + 0,26(±0,02)C <sub>ag</sub> .
6,15	62,2(±0,23)	25,5(±0,64)	16,5(±0,43) 15,9(±0,36) S = 4,24 + 0,33(±0,05)C <sub>ag</sub> .
3,07	72,3(±0,21)	30,1(±0,38)	18,8(±0,71) 16,6(±0,39) S = 3,67 + 0,39(±0,05)C <sub>ag</sub> .

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

TABLA XVII

Ecuaciones de las rectas de regresión, en relación con las diferentes concentraciones del inmunosero anti-PSCA, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.

Porcentaje inmunosero anti-PSCA en agarosa.	Extracto antigénico PSCA (mg. proteína/ml.)			
	163	81,5	40,7	20,3 S = $S_0 + K \cdot C_{ag}$
9,23	60,0(±0,21)	43(±0,16)	33,1(±0,34)	17,3(±0,73) S = $17,27 + 0,28(±0,04)C_{ag}$
6,15	75,4(±0,37)	52,8(±0,51)	35,2(±0,32)	19,6(±0,62) S = $17,34 + 0,37(±0,05)C_{ag}$
3,07	88,2(±0,16)	62,3(±0,42)	40,7(±0,18)	20,4(±0,65) S = $19,61 + 0,45(±0,07)C_{ag}$

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

TABLA XVIII

Ecuaciones de las rectas de regresión, en relación con las diferentes concentraciones del inmunosuero anti-PSC, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.

Porcentaje inmunosuero anti-PSC en agarosa.	175	87,5	43,7	21,8	S = S <sub>0</sub> + K. C <sub>ag</sub> .
9,23	70,8(±0,31)	45,3(±0,71)	23,0(±0,63)	18,0(±0,17)	S = 9,86 + 0,35(±0,03)C <sub>ag</sub> .
6,15	80,1(±0,87)	50,2(±0,10)	27,1(±0,72)	23,7(±0,42)	S = 15,44 + 0,38 C <sub>ag</sub> .
3,07	95,0(±0,51)	58,0(±0,21)	35,3(±0,47)	29,9(±0,26)	S = 21,93 + 0,42 C <sub>ag</sub> .

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.



TABLA XIX

Ecuaciones de las rectas de regresión, en relación con las diferentes concentraciones del inmunosuero anti-PSP, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.

Porcentaje inmunosuero anti-PSP en agarosa.	Extracto antigénico PSP (mg. proteína/ml.)			
	168,1	81,8	40,9	20,4
				$S = S_0 + K \cdot C_{ag}$
9,23	80,1( $\pm 0,32$ )	49,0( $\pm 0,52$ )	23,7( $\pm 0,48$ )	14,1( $\pm 0,15$ )
				$S = 6,27 + 0,46(\pm 0,04)C_{ag}$
6,15	126,6( $\pm 0,23$ )	67,9( $\pm 0,33$ )	39,5( $\pm 0,31$ )	18,8( $\pm 0,81$ )
				$S = 6,63 + 0,74 C_{ag}$
3,07	153,9( $\pm 0,92$ )	73,8( $\pm 0,57$ )	43( $\pm 0,01$ )	19,6( $\pm 0,37$ )
				$S = 1,74 + 0,92 C_{ag}$

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

TABLE XX

Ecuaciones de las rectas de regresión, en relación con las diferentes concentraciones del inmunosuero anti-PSP0, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.

Porcentaje inmunosuero anti-PSP0 en agarosa.	Extracto antigénico PSP0 (mg. proteína/ml.)			S = $S_0 + K \cdot C_{ag}$
	163	81,5	40,7	20,3
9,23	58,0( $\pm 0,22$ )	43( $\pm 0,16$ )	21,3( $\pm 0,67$ )	15,9( $\pm 0,57$ )
6,15	96,7( $\pm 0,53$ )	62,2( $\pm 0,33$ )	34,2( $\pm 0,53$ )	18,8( $\pm 0,17$ )
3,07	109,3( $\pm 0,16$ )	65,0( $\pm 0,24$ )	35,2( $\pm 0,14$ )	21,2( $\pm 0,73$ )
				S = 11,57 + 0,30( $\pm 0,05$ ) $C_{ag}$
				S = 11,91 + 0,54( $\pm 0,05$ ) $C_{ag}$
				S = 10,65 + 0,62 $C_{ag}$

PSP0: Proteína soluble de carne de pollo.

práctica, en una dificultad para medir el diámetro del círculo ya que, los límites se hacen difusos.

Estos resultados, procedentes de los sistemas homólogos, nos han permitido elaborar las correspondientes rectas de regresión, cuyas gráficas se trazan en las figuras 16, 17, 18, 19 y 20. En todos los casos, la pendiente aumenta al disminuir la concentración del antisuero y, como señala Ouchterlony (1.949), existe una relación lineal entre la concentración del antígeno y el área final del precipitado, que también queda ratificada y demostrada en nuestras experiencias.

#### V.D.1.b. Áreas de los halos de precipitación.

El sistema formado por la proteína soluble de carne de perro y el inmunosuero anti-PSP, es el que da un área de precipitación mayor ( $153,9 \pm 0,92 \text{ mm}^2$ ), seguido por los correspondientes al pollo, cerdo, caballo y vaca. Estos resultados no se corresponden exactamente con las determinaciones cuantitativas efectuadas a lo largo del proceso de inmunización, para controlar el título de anticuerpos, por precipitación en tubo capilar.

La no coincidencia de estos resultados puede en nuestra opinión, explicarse al analizar el factor tiempo, que es fijo para la precipitación en tubo capilar y variable en la inmunodifusión radial. Edelman y col., (1.960), señalan al estudiar la reacción de precipitación cuantitativa que, a causa de la heterogeneidad molecular y de la diversa distribución de los receptores activos en

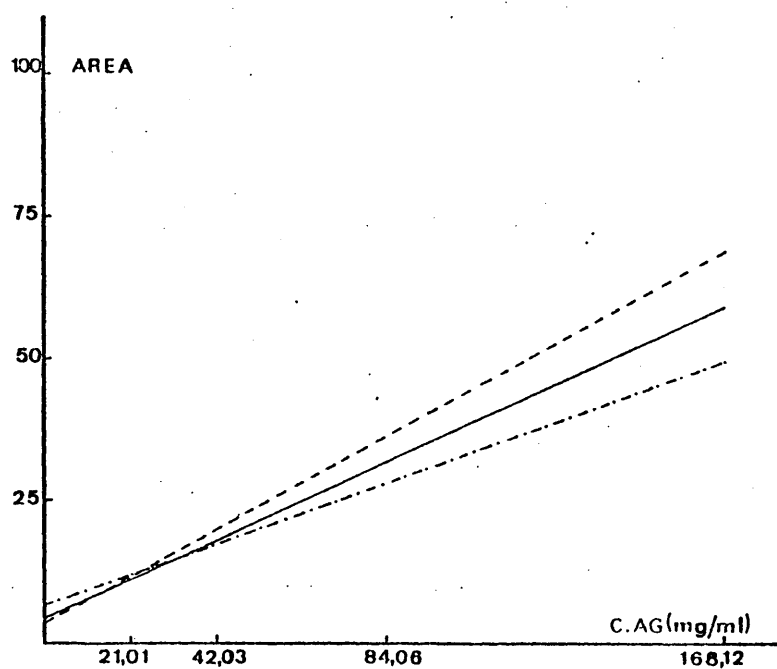


FIG. 16.- Pendiente de la recta de regresión en relación con las diferentes concentraciones del inmunosero anti-PSB, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.

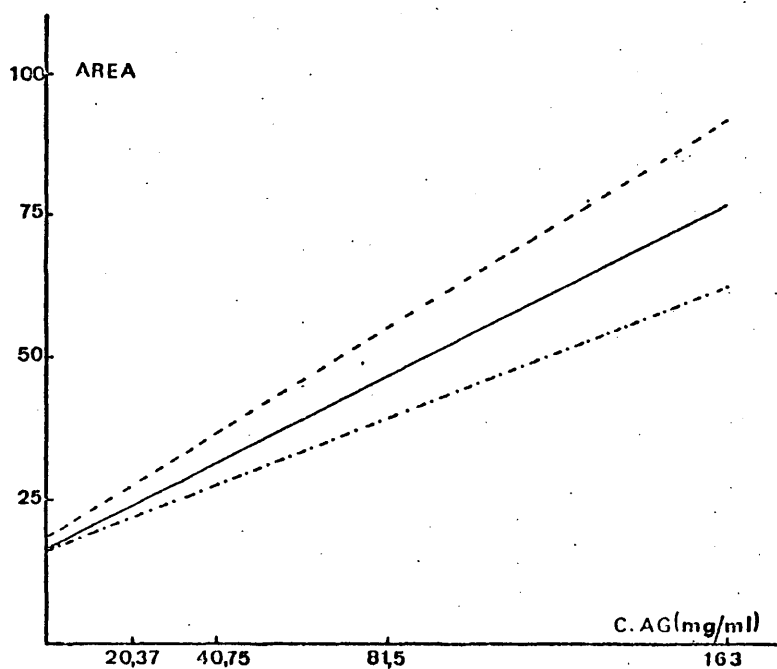


FIG. 17.- Pendiente de la recta de regresión en relación con las diferentes concentraciones del inmunosuero anti-PSCA, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.

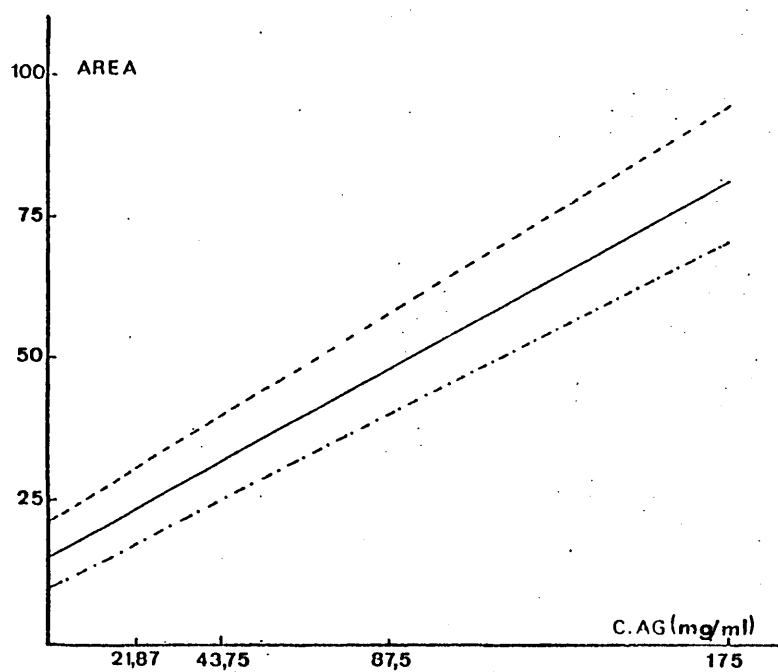


FIG. 18.- Pendiente de la recta de regresión en relación con las diferentes concentraciones del inmunosuero anti-PSC, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.

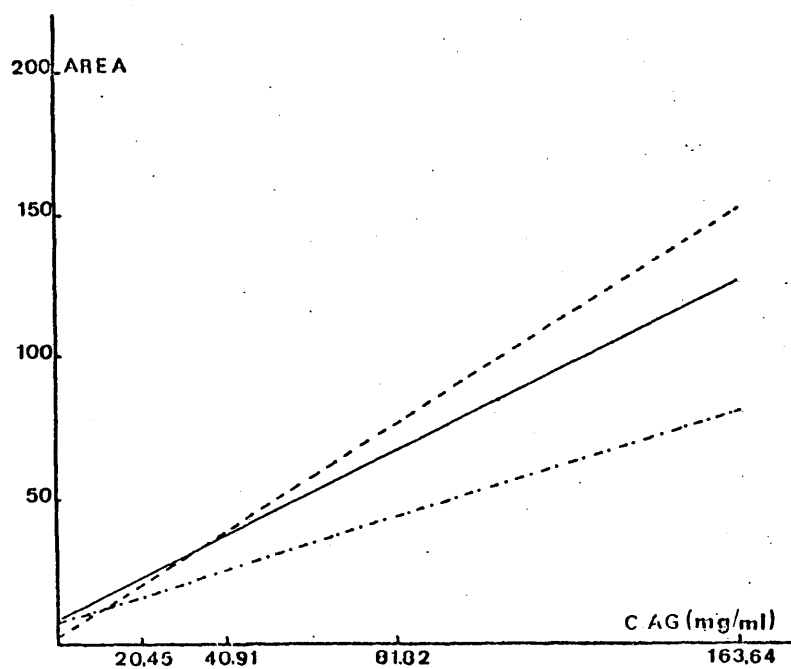


FIG. 19.- Pendiente de la recta de regresión en relación con las diferentes concentraciones del inmunosuero anti-PSP, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.

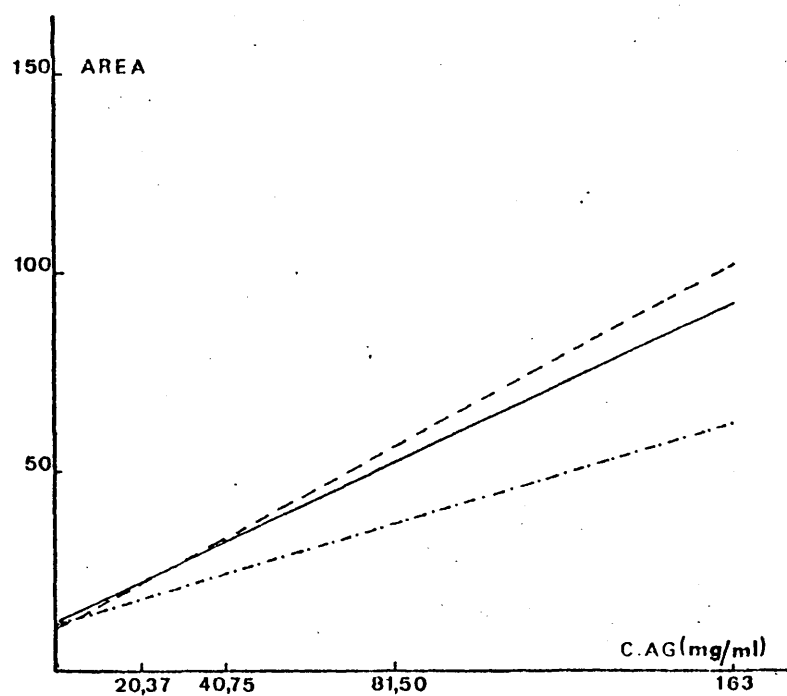


FIG. 20.- Pendiente de la recta de regresión en relación con las diferentes concentraciones del inmunosuero anti-PSPO, frente al extracto antigénico homólogo, por inmunodifusión radial, según Mancini.



las inmunoglobulinas, éstas presentan distintas capacidades de precipitar el antígeno. Ello explicaría el hecho de que, una prueba de precipitación de este tipo, no mediría toda la cantidad de anticuerpos presentes en el inmunosuero que, por otra parte, sí podría detectarse al emplear otra técnica de precipitación, en la que el factor tiempo sea variable. La utilización de pruebas de precipitación, como la inmunodifusión radial, en las que no se diera por finalizado el tiempo de incubación hasta que se haya producido la precipitación de todo el antígeno presente, eliminaría el problema.

#### V.D.2. Sistemas heterólogos.

##### V.D.2.a. Determinación de las concentraciones óptimas de los extractos anticénicos y de los inmunosueros a utilizar en las pruebas.

Para estudiar las posibles reacciones heterólogas, se eligieron las concentraciones de proteínas máxima para el extracto antigénico y, mínima para el antisuero. En este último caso, la cantidad de inmunosuero que se mezclaba con la solución de agarosa, estaba en proporción del 3.07%, para todos los sistemas. Así pues, los valores que utilizaremos para comparar las áreas de precipitación de los sistemas homólogos con los heterólogos y, las de éstos, entre sí, serán siempre las obtenidas con las concentraciones que nos dieron halos de máxima superficie y que, al mismo tiempo, conservaban los límites o contornos

externos suficientemente nítidos, para que las mediciones de su diámetro fueran aceptables.

V.D.2.b. Áreas de los halos de precipitación.

Los resultados, recogidos en las tablas XXI, XXII, XXIII, XXIV y XXV, que estudian el comportamiento de los diversos extractos cárnicos frente a un inmunosuero heterólogo, permiten diferenciar, en cualquier circunstancia, la proteína homóloga de las heterólogas, cuando el antígeno no presenta contaminaciones o impurezas procedentes de otras proteínas musculares. Creemos que estas reacciones cuantitativas, si las hubiéramos efectuado con una mezcla de proteínas solubles de diversas especies animales, pudieran haber llegado a valores muy próximos, a los de las proteínas homólogas puras y, en consecuencia, no tendría valor en la diferenciación de las mismas.

En el caso del inmunosuero anti-PSB, el área más grande y, por lo tanto, responsable de la reacción cruzada cuantitativamente más importante, es la producida con el extracto antigénico PSP. No obstante, existen comunidades con todos los antígenos detectables por esta prueba, siendo el extracto PSCA el que presenta un valor más bajo (tabla XXI).

Frente al inmunosuero anti-PSCA, las comunidades antigénicas son, en general, menores que en el sistema estudiado anteriormente ya que, el caso de mayor afinidad, como se observa en la tabla XXII, corresponde al extracto de proteínas solubles de carne de perro (PSP), cuya

TABLA XXI

Resultados de las pruebas de inmunodifusión radial, según Mancini, correspondientes a las áreas de precipitación, de los diversos extractos antigénicos, frente al inmunosero anti-PSB.

Extractos antigénicos.	Superficie en mm <sup>2</sup> .	Superficie porcentaje.
PSPD	26,4(±0,17)	36,5
PSC	33,1(±0,34)	45,8
PSB	72,3(±0,21)	100
PSP	43(±0,16)	59,4
PSCA	15,2(±0,31)	21

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

TÁBLA XXII

Resultados de las pruebas de inmunodifusión radial, según Mancini, correspondientes a las áreas de precipitación, de los diversos extractos antigénicos, frente al inmunosuero anti-PSCA.

Extractos antigénicos.	Superficie en mm <sup>2</sup> .	Superficie porcentaje.
PSPC	25,5(±0,67)	28,9
PSC	27,3(±0,15)	30,9
PSB	15,9(±0,24)	18,0
PSP	37,3(±0,32)	42,3
PSCA	88,2(±0,16)	100

PSPC: Proteína soluble de carne de pollo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

superficie en porcentaje es sólo del 42,3%.

Al analizar los resultados de los diversos extractos cárnicos, frente al inmunosuero anti-PSC (tabla XXIII), nos encontramos con que, la proteína procedente de pollo es la que presenta un valor más alto (71,4% del área del sistema homólogo). Este relativo inconveniente para diferenciar la carne de pollo de la porcina tiene interés práctico ya que, actualmente y, debido al menor precio de la primera, se utiliza la carne de aves de forma fraudulenta, como sustitutivo de otras de más valor económico, en la fabricación de ciertos embutidos y fiambres.

El extracto antigénico de carne de vaca sólo da una lectura de 16,7% de la superficie de precipitación del sistema homólogo, por lo que podría fácilmente diferenciarse de la porcina, a través de estas sencillas pruebas de inmunodifusión radial y, frente al inmunosuero anti-PSC.

En la tabla XXIV, se recogen los resultados frente al inmunosuero anti-PSP y, a través de ellos, podemos comprobar que la mayor afinidad o proximidad de los valores con los obtenidos en el sistema homólogo, la presentan el cerdo y el pollo, mientras que, las proteínas musculares de vaca y caballo sólo representan cuantitativamente el 31,0 y el 27,9% del área de precipitación correspondiente al PSP anti-PSP.

Los resultados de las pruebas de inmunodifusión radial efectuadas con inmunosuero anti-PSPO, han sido positivas, con valores más o menos altos. Las reacciones cruzadas más importantes se establecen con las proteínas musculares de cerdo y perro y, en menor grado, con las de caballo y vaca (tabla XXV).

TABLA XXIII

Resultados de las pruebas de inmunodifusión radial, según Mancini, correspondientes a las áreas de precipitación, de los diversos extractos antigénicos, frente al inmunosuero anti-PSC.

Extractos antigénicos.	Superficie en mm <sup>2</sup> .	Superficie porcentaje.
PSPD	67,9(±0,23)	71,4
PSC	95,0(±0,51)	100
PSB	15,9(±0,63)	16,7
PSP	50,2(±0,71)	52,8
PSCA	27,3(±0,22)	28,7

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

TABLA XXIV

Resultados de las pruebas de inmunodifusión radial, según Mancini, correspondientes a las áreas de precipitación, de los diversos extractos antigénicos, frente al inmunosuero anti-PSP.

Extractos antigénicos.	Superficie en mm <sup>2</sup> .	Superficie porcentaje.
PSPD	75,4(±0,31)	49
PSC	83,3(±0,17)	54,1
PSB	47,7(±0,21)	31,0
PSP	153,9(±0,92)	100
PSCA	43(±0,16)	27,9

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

145

TABLA XXV

Resultados de las pruebas de inmunodifusión radial, según Mancini, correspondientes a las áreas de precipitación, de los diversos extractos antigénicos, frente al inmunosuero anti-PSP0.

Extractos antigénicos.	Superficie en mm <sup>2</sup> .	Superficie porcentaje.
PSP0	109,3(±0,16)	100
PSC	60,0(±0,31)	55,6
PSB	20,4(±0,44)	18,6
PSP	59,4(±0,31)	54,3
PSCA	35,2(±0,45)	32,2

- PSP0: Proteína soluble de carne de pollo.
- PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.
- PSB: Proteína soluble de carne de vaca.
- PSP: Proteína soluble de carne de perro.
- PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.



Si comparamos estos resultados con los de inmunodifusión e inmunolectroforesis, nos encontramos con que, mientras las reacciones cuantitativas son positivas frente al inmunosuero anti-PSPO, las cualitativas son negativas para todos los sistemas heterólogos. Creemos que la explicación puede radicar en el conocido postulado de que, al aumentar la sensibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo se disminuye paralelamente la especificidad.

V.E. COMPOSICION ANTIGENICA DE DIVERSOS EXTRACTOS DE PROTEINAS SOLUBLES MUSCULARES, FRENTE A INMUNOSUEROS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS, POR INMUNOELECTROFORESIS EN AGAROSA (PH 8,6), SEGUN SCHMIDEGGER.

V.E.1. Sistemas homólogos.

V.E.1.a. Determinación de la concentración óptima de los extractos antigénicos a utilizar en las pruebas.

Las diluciones de los extractos antigénicos, empleados en las inmunolectroforesis, frente a antisueros homólogos, fueron las mismas que dieron resultados óptimos en las pruebas de inmunodifusión. Aunque es sabido que toda sustancia sometida a emigración electroforética sufre una dilución relativa, al avanzar por el medio gelificado, las inmunolectroforesis eran satisfactorias al utilizar las mismas concentraciones y, por otra parte, los resultados, así obtenidos, eran más homogéneos y comparables.

De acuerdo con esta premisa, todos los

extractos utilizados para inmunolectroforesis tenían 24 mg. de antígeno liofilizado por ml. o sea, estaban diluidos al 1/2.

V.E.l.b. Número de fracciones diferenciadas y movilidades electroforéticas.

Como se observa en la tabla XXVI, el extracto de proteína soluble de carne de vacuno (PSB), frente al inmunosero homólogo, permitió diferenciar, por inmunolectroforesis, seis fracciones, de movilidades electroforéticas porcentuales comprendidas entre 9 ( $\pm 1,15$ ) y 89 ( $\pm 0,89$ ) (figura 21). Ninguno de estos componentes se corresponde con la seroalbúmina bovina (movilidad porcentual 100), que se utilizaba como sustancia de referencia, a pesar de que ciertos investigadores (Murakami y col., 1.969), como ya hemos citado en otra ocasión, resaltan el hecho de la contaminación de las proteínas solubles musculares con proteínas séricas.

Por otro lado, detectamos dos fracciones mayores, que se apreciaban perfectamente, en los inmunoseros obtenidos a los veintiocho días del período de inmunización, como se señala en la tabla XXVII. Las pruebas de caracterización immunoquímica, para glicó y lipoproteínas, fueron negativas en el sistema antígeno-anticuerpo en estudio.

No hemos encontrado trabajo alguno que enumere las fracciones del extracto antigénico de carne bovina, frente al inmunosero homólogo. Únicamente Kaminski, (1.957), encuentra diez arcos de precipitación, con seis

TABLA XXVI

Movilidades electroforéticas absolutas, relativas y porcentuales de los componentes antigénicos, correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de vaca (PSB), frente al inmunosuero homólogo anti-PSB.

A	B	C	D	E	F
1	-3,5( $\pm$ 0,70)	3,5	0,40( $\pm$ 0,08)	0,09	9( $\pm$ 1,15)
2	0,5( $\pm$ 0,40)	7,5	0,86( $\pm$ 0,04)	0,20	20( $\pm$ 0,50)
3	4,5( $\pm$ 1,00)	11,5	1,33( $\pm$ 0,11)	0,31	31( $\pm$ 0,17)
4	6( $\pm$ 1,50)	15	1,73( $\pm$ 0,20)	0,40	40( $\pm$ 0,74)
5	9,5( $\pm$ 1,80)	16,5	1,96( $\pm$ 0,20)	0,44	44( $\pm$ 1,26)
6	26( $\pm$ 3,00)	33	3,81( $\pm$ 0,35)	0,89	89( $\pm$ 0,89)
Al. bovina	30( $\pm$ 3,00)	37	4,28( $\pm$ 0,34)	1	100
Dextrano	-7( $\pm$ 1,00)	0	0	0	0

A= Número del componente antigénico.

B= Desplazamiento en mm. desde el pocillo.

C= Desplazamiento real en mm.

D= Movilidad absoluta.

E= Movilidad relativa.

F= Movilidad porcentual.

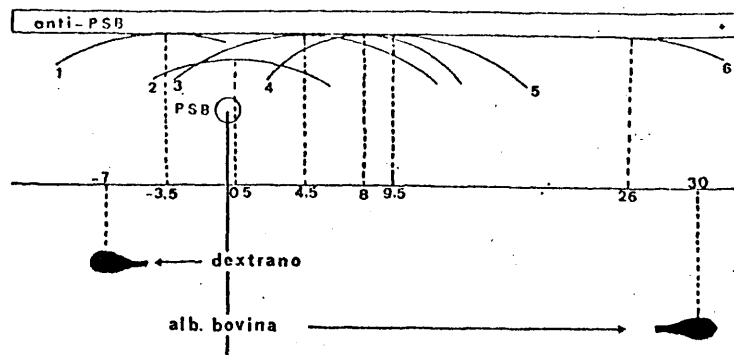


FIG. 21.- Esquema y reproducción fotográfica de los componentes antígenicos correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de vacuno (PSB), frente al inmunosuero homólogo, por inmunoelectroforesis en gel de agarosa (pH 8,6), según Scheidegger.

TABLA XXVII

Determinación y caracterización inmunológica de los componentes inmuno-electroforéticos mayores y menores, detectados durante el período de inmunización, correspondientes al extracto antigénico PSB, frente al inmunosero homólogo.

<u>Período de inmunización</u>		<u>Número de los componentes</u>		<u>Caracterización inmunológica</u>	
<u>Sangrías</u>	<u>Días</u>	<u>Mayores</u>	<u>Menores</u>	<u>Glicoproteínas</u>	<u>Lipoproteínas</u>
S <sub>1</sub>	12	-	-	-	-
S <sub>2</sub>	28	(3) (4)	-	-	-
S <sub>3</sub>	48	-	(2) (5)	-	-
S <sub>F</sub>	62	-	(1) (5)	-	-

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

componentes fuertes, en un suero de conejo anti-gammaglobulinas de buey.

Las seis fracciones halladas por nosotros pueden localizarse fácilmente pues, con la excepción de los arcos de precipitación números 4 y 5, de movilidades muy próximas, los demás presentan valores suficientemente dispersos.

En la tabla XXVIII, se puede comprobar que, el extracto soluble de carne de caballo (PSCA), enfrentado al inmunosuero homólogo, da lugar a siete arcos de precipitación (figura 22). Kaminski (1.957), trabajando con un suero de caballo inoculado en conejo, encuentra siete bandas y, cuando emplea la cabra para obtener el inmunosuero, llega a diferenciar nueve.

En la tabla XXIX, se comprueba que, el PSCA permite diferenciar un componente mayor, que se corresponde con la fracción número 2, de movilidad porcentual 24 ( $\pm 0,73$ ). La técnica NADI, para la caracterización de glicoproteínas fué positiva para los componentes menores números 3 y 6.

El sistema representado por el extracto soluble de proteína de carne de cerdo (PSC) y el antisuero homólogo, evidencia seis componentes inmunolectroforéticos (figura 23), de los que dos de ellos, tienen movilidades muy próximas (16  $\pm 0,04$  y 17  $\pm 1,03\%$  en relación a la seroalbúmina bovina) y, por lo tanto, difícilmente diferenciables (tabla XXX).

TABLA XXVIII

Movilidades electroforéticas absolutas, relativas y porcentuales de los componentes antigénicos, correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de caballo (PSCA), frente al inmunosuero homólogo anti-PSCA.

A	B	C	D	E	F
1	-2,5( $\pm 0,95$ )	4,5	0,52( $\pm 0,09$ )	0,12	12( $\pm 1,73$ )
2	2( $\pm 0,50$ )	9	1,04( $\pm 0,05$ )	0,24	24( $\pm 0,73$ )
3	9( $\pm 1,70$ )	16	1,85( $\pm 0,20$ )	0,43	43( $\pm 2,00$ )
4	12( $\pm 1,50$ )	19	2,19( $\pm 0,26$ )	0,51	51( $\pm 2,34$ )
5	13( $\pm 2,00$ )	20	2,31( $\pm 0,24$ )	0,54	54( $\pm 1,02$ )
6	17( $\pm 2,00$ )	24	2,77( $\pm 0,24$ )	0,64	64( $\pm 0,20$ )
7	29( $\pm 3,00$ )	36	4,16( $\pm 0,15$ )	0,97	97( $\pm 0,22$ )
Al. Bovina	30( $\pm 3,00$ )	37	4,28( $\pm 0,34$ )	1	100
Dextrano	-7( $\pm 1,00$ )	0	0	0	0

A= Número del componente antigénico.

B= Desplazamiento en mm. desde el pocillo.

C= Desplazamiento real en mm.

D= Movilidad absoluta.

E= Movilidad relativa.

F= Movilidad porcentual.

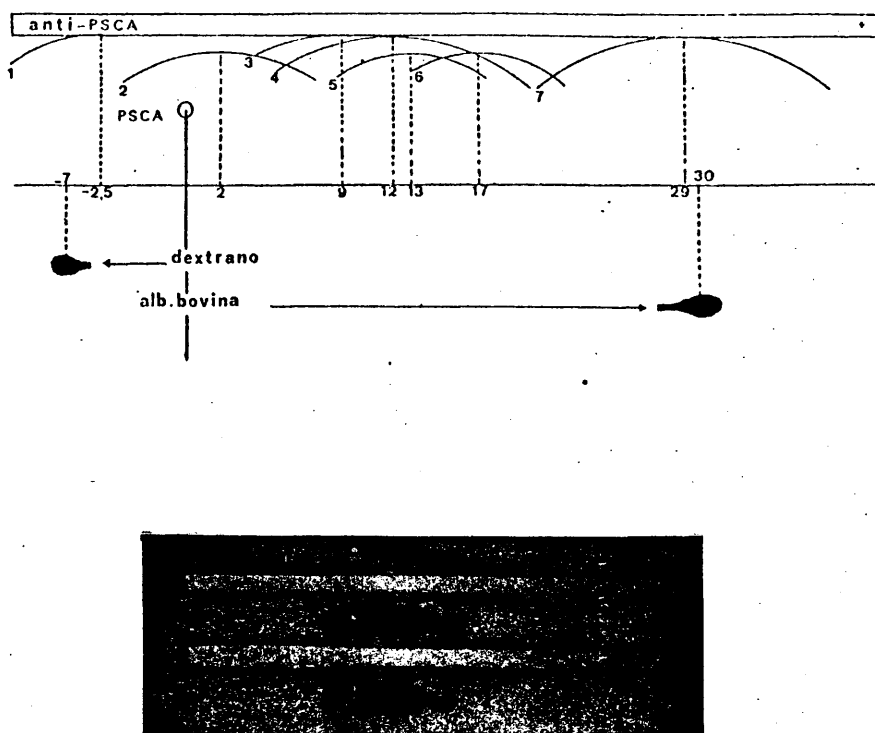


FIG. 22.- Esquema y reproducción fotográfica de los componentes antigénicos correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de caballo (PSCA), frente al inmunosero homólogo, por inmunoelectroforesis en gel de agarosa (pH 8,6), según Scheidegger.



TABLE XXIX

Determinación y caracterización inmunológica de los componentes inmuno-  
electroforéticos mayores y menores, detectados durante el período de inmunización,  
correspondientes al extracto antigénico PSCA, frente al inmunosero homólogo.

<u>Período de inmunización</u>		<u>Número de los componentes</u>		<u>Caracterización inmunológica</u>	
<u>Sangrías</u>	<u>Días</u>	<u>Mayores</u>	<u>Menores</u>	<u>Glicoproteínas</u>	<u>Lipoproteínas</u>
S <sub>1</sub>	12	-	-	-	-
S <sub>2</sub>	28	(2)	-	-	-
S <sub>3</sub>	48	-	(1)(4)(7)	-	-
S <sub>f</sub>	62	-	(3)(5)(6)	(3)(6)	-

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

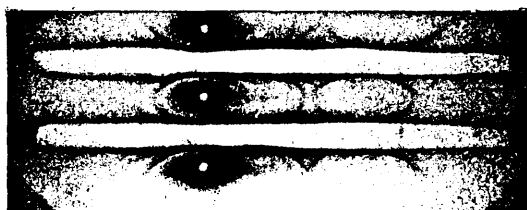
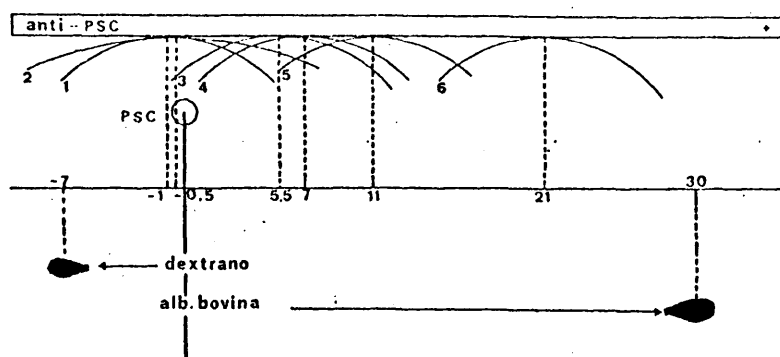


FIG. 23.- Esquema y reproducción fotográfica de los componentes antigénicos correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de cerdo (PSC), frente al inmunosuero homólogo, por inmunolectroforesis en gel de agarosa ( $pH$  8,6), según Scheidegger.

TABLA XXX

Movilidades electroforéticas absolutas, relativas y porcentuales de los componentes antigénicos, correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de cerdo (PSC), frente al inmunosero homólogo anti-PSC.

A	B	C	D	E	F
1	-1( $\pm 0,50$ )	6	0,69( $\pm 0,06$ )	0,16	15( $\pm 0,04$ )
2	-0,5( $\pm 0,50$ )	6,5	0,75( $\pm 0,06$ )	0,17	17( $\pm 1,03$ )
3	5,5( $\pm 1,50$ )	12,5	1,44( $\pm 0,22$ )	0,33	33( $\pm 1,31$ )
4	7( $\pm 1,50$ )	14	1,62( $\pm 0,17$ )	0,37	37( $\pm 1,09$ )
5	11( $\pm 1,70$ )	18	2,08( $\pm 0,20$ )	0,40	40( $\pm 0,66$ )
6	21( $\pm 2,00$ )	20	3,24( $\pm 0,30$ )	0,75	75( $\pm 1,70$ )
Al. Bovina	30( $\pm 3,00$ )	37	4,20( $\pm 0,34$ )	1	100
Dextrano	-7( $\pm 1,00$ )	0	0	0	0

A= Número del componente antigénico.

B= Desplazamiento en mm. desde el pocillo.

C= Desplazamiento real en mm.

D= Movilidad absoluta.

E= Movilidad relativa.

F= Movilidad porcentual.

Tormo y col., (1.967), aislan venticuatro fracciones al efectuar la inmunoelectroforesis del suero porcino, frente al antisuero homólogo. La finalidad de este trabajo no se ha centrado en detectar un número más o menos elevado de componentes, sino como veremos más adelante, al analizar los resultados de los sistemas heterólogos, hemos considerado de más interés, caracterizar las fracciones específicas y con mayor capacidad antigénica. Estas pueden identificarse mejor, cuando es menor el número de componentes antigénicos.

El extracto antigénico PSC, frente al inmunosuero homólogo evidenció tres fracciones mayores (tabla XXXI), de las que, la número 1, se observaba en el antisuero recogido a los doce días de inmunización, mientras que las números 4 y 6, se detectaron en el inmunosuero correspondiente a la sangría  $S_2$ , efectuada a los ventiocho días. La dificultad para identificar los componentes números 1 y 2, que aparecen muy próximos en el inmunoelectroferograma, se resuelve al efectuar la lectura y observar que, el número 1 es una fracción mayor. En relación con la caracterización immunoquímica es de destacar, la naturaleza glicoprotéica del componente menor número 5.

Estas técnicas aplicadas al suero porcino (Tormo y col., 1.967), diferenciaron una lipoproteína y cinco glicoproteínas, de las que una (movilidad 44%) podría corresponderse con la identificada por nosotros.

En la tabla XXXII, se reseñan las movilidades electroforéticas, correspondientes a las siete

TABLA XXXI

.Determinación y caracterización inmunológica de los componentes inmuno-electroforéticos mayores y menores, detectados durante el período de inmunización, correspondientes al extracto antigénico PSC, frente al inmunosero homólogo.

<u>Período de inmunización</u>		<u>Número de los componentes</u>		<u>Caracterización inmunológica</u>	
<u>Sangrías</u>	<u>Días</u>	<u>Mayores</u>	<u>Menores</u>	<u>Glicoproteínas</u>	<u>Lipoproteínas</u>
S <sub>1</sub>	12	(1)	-	-	-
S <sub>2</sub>	28	(4)(6)	-	-	-
S <sub>3</sub>	48	-	(2)(3)(5)	(5)	-
S <sub>F</sub>	62	-	-	-	-

pSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

TABLA XXXII

Movilidades electroforéticas absolutas, relativas y porcentuales de los componentes antigénicos, correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de perro (PSP), frente al inmunosuero homólogo anti-PSP.

A	B	C	D	E	F
1	-6( $\pm 1,06$ )	1	0,11( $\pm 0,10$ )	0,02	2( $\pm 1,70$ )
2	-0,5( $\pm 0,50$ )	6,5	0,75( $\pm 0,06$ )	0,17	17( $\pm 0,10$ )
3	4( $\pm 1,20$ )	11	1,27( $\pm 0,21$ )	0,29	29( $\pm 0,84$ )
4	5( $\pm 1,50$ )	12	1,36( $\pm 0,18$ )	0,32	32( $\pm 1,43$ )
5	9,5( $\pm 1,70$ )	16,5	1,90( $\pm 0,11$ )	0,44	44( $\pm 0,99$ )
6	14( $\pm 2,00$ )	21	2,43( $\pm 0,23$ )	0,56	56( $\pm 0,81$ )
7	29( $\pm 3,00$ )	36	4,16( $\pm 0,35$ )	0,97	97( $\pm 0,23$ )
Al. Bovina	30( $\pm 3,00$ )	37	4,28( $\pm 0,34$ )	1	100
Dextrano	-7( $\pm 1,00$ )	0	0	0	0

A= Número del componente antigénico.

B= Desplazamiento en mm. desde el pocillo.

C= Desplazamiento real en mm.

D= Movilidad absoluta.

E= Movilidad relativa.

F= Movilidad porcentual.

fracciones aisladas en el sistema formado por proteína soluble de carne de perro (PSP) y el inmunosuero homólogo (figura 24). De todos los extractos antigénicos analizados por inmunoelectroforesis, éste es el que presenta un componente de menor movilidad ( $2 \pm 1,70\%$  en relación a la seroalbúmina bovina), que puede diferenciarse fácilmente, no sólo del resto de las fracciones del antígeno PSP, sino también, de las correspondientes a las demás especies animales estudiadas.

Nuevamente nos vemos obligados a comparar nuestros resultados con los obtenidos en el suero de la misma especie que, por otra parte, siempre se ha venido utilizando para la diferenciación de proteínas cárnicas, a través de técnicas de rutina.

Bruchieri y Grasso (1.966), aislan veintinueve arcos de precipitación y, resaltan la presencia de un componente de escasa movilidad (que denominan catódico), que podría corresponderse con el de movilidad 2 ( $\pm 1,70\%$ ). Para confirmar esta hipótesis, sería necesario efectuar pruebas con inmunosueros absorbidos.

El extracto de carne de perro (PSP), ha permitido aislar tres componentes mayores, de los que el número 2 se detecta en el antisuero de conejo obtenido a los doce días de inmunización, mientras que, las fracciones números 1 y 7, precisan veintiocho días, para que la respuesta de anticuerpos sea visible por la técnica (tabla XXXIII). El componente número 1, que es fácilmente aislable por su escasa movilidad, es además una fracción mayor, por lo que su importancia aumenta, en relación con

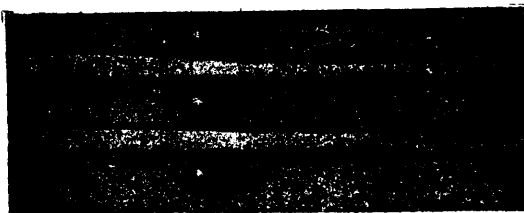
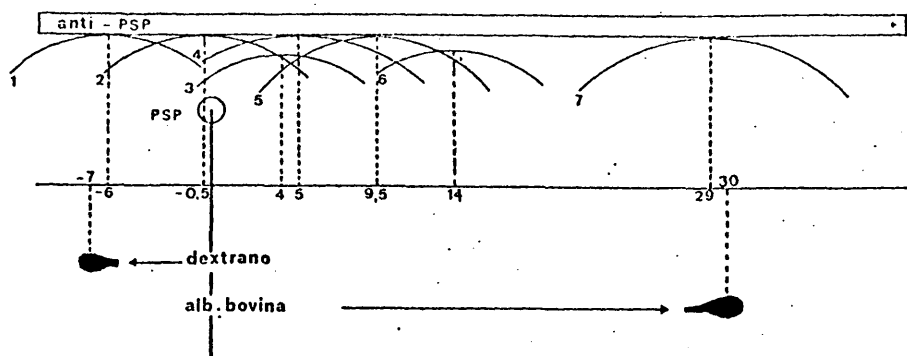


FIG. 24.- Esquema y reproducción fotográfica de los componentes antigénicos correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de perro (PSP), frente al inmunosero homólogo, por inmunoelectroforesis en gel de agarosa (pH 8,6), según Scheidegger.



TABLA XXXIII

Determinación y caracterización inmunológica de los componentes inmunoelectroforéticos mayores y menores, detectados durante el período de inmunización, correspondientes al extracto antigénico PSP, frente al inmunosero homólogo.

<u>Período de inmunización</u>		<u>Número de los componentes</u>		<u>Caracterización inmunológica</u>	
<u>Sangrías</u>	<u>Días</u>	<u>Mayores</u>	<u>Menores</u>	<u>Glicoproteínas</u>	<u>Lipoproteínas</u>
S <sub>1</sub>	12	(2)	-	-	-
S <sub>2</sub>	28	(1)(7)	-	-	-
S <sub>3</sub>	48	-	(3)(5)(4)	-	-
S <sub>F</sub>	62	-	(6)	(6)	-

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

su papel en la identificación del extracto antigénico de carne de perro.

Por último, la caracterización immunoquímica para glicoproteínas fué positiva en relación con el componente número 6 (movilidad 56  $\pm 0,61\%$ ).

Finalmente, en la tabla XXXIV, estudiamos las seis fracciones halladas, por inmunolectroforesis, entre el extracto de carne de pollo (PSPO) y el immuno-suero homólogo (figura 25). Las movilidades de los distintos componentes facilitan su localización en el immuno-electroferograma, ya que no aparecen valores próximos.

A pesar de que, generalmente, el número de fracciones antigénicas es superior cuando se emplea la técnica de inmunolectroforesis que, cuando se efectúa la inmunodifusión en gel, en este caso, se detectó el mismo número con uno y otro procedimiento.

Este extracto de proteína soluble de pollo ha facilitado la identificación de tres componentes mayores (números 1, 3 y 6) cuando se enfrentó al immunosuero correspondiente. Las tres fracciones son de aparición precoz en el antisuero de conejo (tabla XXXV) y, de ellas, la número 3 (movilidad porcentual 44  $\pm 0,44$ ) es además de carácter lipoprotéico. Es de señalar, que los demás extractos antigénicos, correspondientes a mamíferos, han sido siempre negativos, en relación con esta prueba immunoquímica. Por otro lado, el componente menor número 2 se corresponde, immunoquímicamente, con una glicoproteína.

TABLA XXXIV

Movilidades electroforéticas absolutas, relativas y porcentuales de los componentes antigénicos, correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de pollo (PSP0), frente al inmunosuero homólogo anti-PSP0.

A	B	C	D	E	F
1	0,5( $\pm$ 0,50)	6,5	0,75( $\pm$ 0,06)	0,17	17( $\pm$ 0,27)
2	4( $\pm$ 1,00)	11	1,27( $\pm$ 0,11)	0,29	29( $\pm$ 0,29)
3	9,5( $\pm$ 1,50)	16,5	1,90( $\pm$ 0,18)	0,44	44( $\pm$ 0,44)
4	16( $\pm$ 2,00)	23	2,66( $\pm$ 0,23)	0,62	62( $\pm$ 0,37)
5	22,5( $\pm$ 3,00)	29,5	3,41( $\pm$ 0,35)	0,79	79( $\pm$ 1,66)
6	24,5( $\pm$ 3,00)	31,5	3,64( $\pm$ 0,35)	0,85	85( $\pm$ 1,21)
Al. Bovina	30( $\pm$ 3,00)	37	4,28( $\pm$ 0,34)	1	100
Dextrano	-7( $\pm$ 1,00)	0	0	0	0

A= Número del componente antigénico.

B= Desplazamiento en mm. desde el pocillo.

C= Desplazamiento real en mm.

D= Movilidad absoluta.

E= Movilidad relativa.

F= Movilidad porcentual.

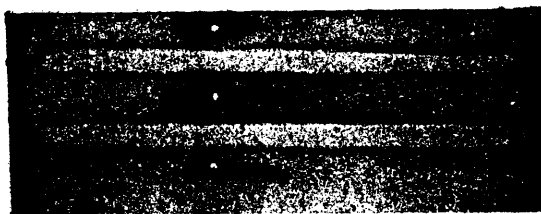
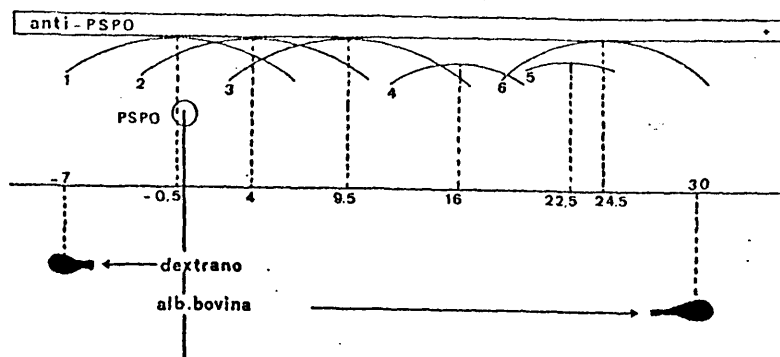


FIG. 25.- Esquema y reproducción fotográfica de los componentes antigénicos correspondientes al extracto de proteína soluble de carne de pollo (PSPO), frente al inmunosuero homólogo, por inmunoelectroforesis en gel de agarosa (pH 8,6), según Scheidegger.

TABLA XXXV

Determinación y caracterización inmunoquímica de los componentes inmuno-electroforéticos mayores y menores, detectados durante el período de inmunización, correspondientes al extracto antigénico PSPO, frente al inmunosuero homólogo.

<u>Período de inmunización</u>		<u>Número de los componentes</u>		<u>Caracterización inmunoquímica</u>	
<u>Sangrías</u>	<u>Días</u>	<u>Mayores</u>	<u>Menores</u>	<u>Glicoproteínas</u>	<u>Lipoproteínas</u>
S <sub>1</sub>	12	(1)(3)(6)	-	-	(3)
S <sub>2</sub>	28	-	-	-	-
S <sub>3</sub>	48	-	(2)(4)	(2)	-
S <sub>F</sub>	52	-	(5)	-	-

PSPO: Proteína soluble de carne de pollo.

V.E.2. Sistemas heterólogos.

V.E.2.a. Determinación de la concentración óptima de los extractos antigénicos a utilizar en las pruebas.

Los extractos antigénicos utilizados en las técnicas de inmunolectroforesis frente a antisueros heterólogos, no se diluyeron, excepto, en el caso de la proteína soluble de carne de perro (PSP) que, se diluyó al 1/2. En consecuencia, los antígenos procedentes de carne de vacuno, caballo, cerdo y pollo contenían 48 mg. de polvo liofilizado por ml. y, 24 mg. cuando se preparó a partir de PSP.

Al discutir los resultados obtenidos por inmunodifusión citábamos la conveniencia de utilizar sistemas antígeno-anticuerpo más concentrados para las reacciones heterólogas. Creemos que, con la inmunolectroforesis, está aún más indicado ya que el extracto antigénico se diluye de forma relativa, al producirse la emigración electroforética. En este sentido, podríamos añadir que, si el extracto cárnico es heterólogo respecto al inmunosuero, al concentrar el antígeno aumentamos las posibilidades de que los escasos grupos determinantes de la reacción heteróloga se acoplen a los lugares receptores de la molécula de anticuerpo y den lugar a una línea de precipitación visible (Carpenter, 1.975).

V.E.2.b. Número de fracciones diferenciadas y movilidades electroforéticas.

De las fracciones totales halladas en el extracto soluble de proteína de carne de bóvido (PSB), la número 2 (con movilidad porcentual  $20 \pm 0,50$ ) era común a los antígenos de carne de caballo, cerdo y perro (figura 26). En consecuencia, consideramos que, este componente es el responsable de las falsas reacciones positivas, que aparecen al efectuar las técnicas habituales de diferenciación de proteínas solubles cárnicas, entre las especies domésticas estudiadas.

Kaminski (1.957), al realizar pruebas de inmunoelectroforesis con inmunosuero de conejo antigammaglobulinas de buey frente a suero de caballo, encuentra cinco arcos comunes, de los que sólo uno, corresponde a una línea de precipitación fuerte. Pensamos que, al sustituir los sistemas suero-antisuero o anti-gammaglobulinas por los extractos cárnicos y los inmunosueros utilizados en este trabajo, conseguimos disminuir la proporción de falsas reacciones positivas, al eliminar algunas de las fracciones comunes procedentes del suero.

Ya que tres de los componentes antigénicos específicos de PSB, tienen movilidades de 40 ( $\pm 0,74$ ), 44 ( $\pm 1,26$ ) y 89 ( $\pm 0,89$ )%, en relación con la seroalbúmina bovina y, por lo tanto, sin posibilidad de confusión con la fracción responsable de la comunidad antigénica (movilidad porcentual  $20 \pm 0,50$ ), la técnica de inmunoelectroforesis puede tener aplicación práctica para la diferenciación de proteínas solubles de músculo de buey.

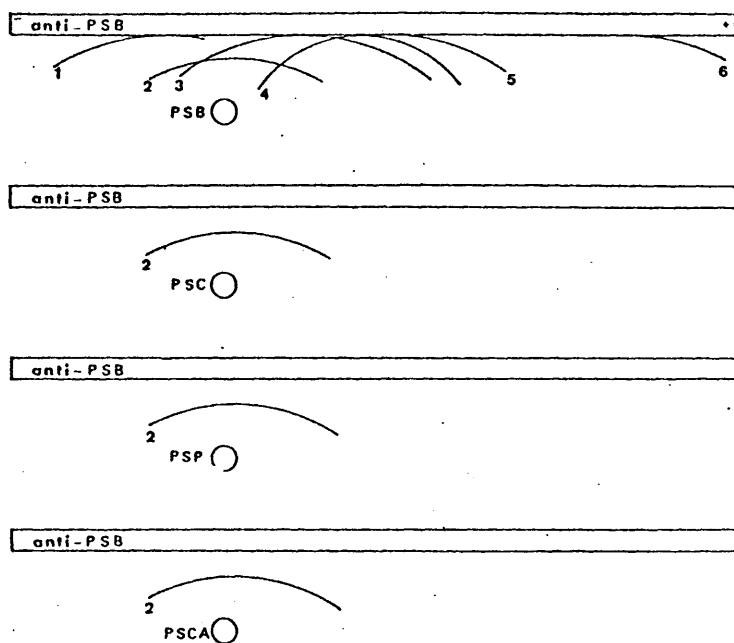


FIG. 26.- Esquema de la inmunolectroforesis en gel de agarosa (pH 8,6), según Scheidegger, realizada con diversos extractos antigénicos frente al inmunosero anti-PSB, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.



Las fracciones números 3 y 4 de movilidades porcentuales 31 ( $\pm 0,17$ ) y 40 ( $\pm 0,74$ ) respectivamente, tienen dentro de los límites del presente trabajo, el máximo interés como componentes fácilmente diferenciables, por tratarse de fracciones mayores y, al mismo tiempo, por su carácter específico (tablas XXVII y XXXVI).

El análisis de los diversos antígenos por inmunoelectroforesis, permite afirmar que, la analogía antigénica con el inmunosuero anti-PSCA es mayor para las proteínas solubles de carne de buey (tres fracciones comunes), que para las de perro (dos componentes) y que, para las de cerdo (uno sólo). Con las proteínas de músculo de pollo no se ha encontrado relación antigénica de ningún tipo (figura 27).

Como se da la circunstancia de que, la fracción número 1 (movilidad porcentual 12  $\pm 1,73$ ) se repite en los "mosaicos antigénicos", correspondientes a las proteínas cárnicas de tres especies animales (vaca, perro y cerdo) es, posiblemente, el componente que juega un papel más importante, como responsable de las falsas reacciones positivas.

De las cuatro fracciones específicas, las de movilidad porcentual 64 ( $\pm 0,20$ ) y 97 ( $\pm 0,22$ ), son las que más fácilmente pueden identificarse por inmunoelectroforesis.

En el trabajo publicado por Kaminski (1.957), se citan siete arcos comunes entre el suero de buey y el inmunosuero de conejo antisuero de caballo, lo que ratifica nuestra idea de que, se consiguen resultados más específicos con inmunosueros anti-proteínas cárnicas que con los preparados por inoculación de proteínas séricas.

TABLA XXXVI

Movilidades porcentuales, en relación a la seroalbúmina bovina, de las fracciones homólogas y heterólogas, de los diversos extractos antigénicos, diferenciadas por inmunoelectroforesis en gel de agarosa, según Scheidegger, frente al suero anti-PSB, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

Número	Fracciones antigénicas				
	Homólogas: Movilidad porcentual	Heterólogas			
		PSC	PSP	PSCA	PSPD
1	9 ( $\pm 1,15$ )	-	-	-	-
2	20 ( $\pm 0,50$ )	+	+	+	-
3	31 ( $\pm 0,17$ )	-	-	-	-
4	40 ( $\pm 0,74$ )	-	-	-	-
5	44 ( $\pm 1,26$ )	-	-	-	-
6	89 ( $\pm 0,89$ )	-	-	-	-

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo..

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

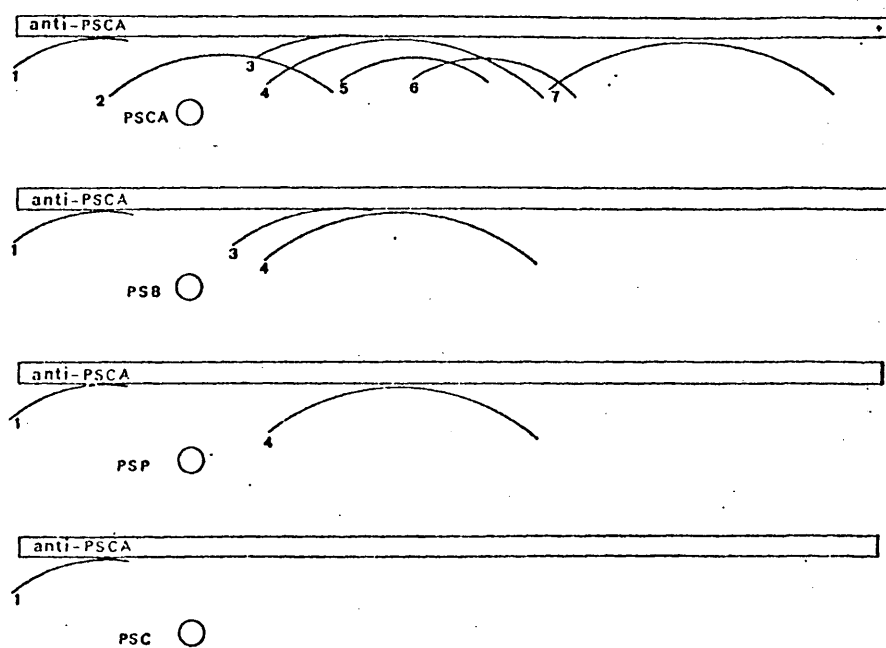


FIG. 27.- Esquema de la inmunolectroforesis en gel de agarosa (pH 8,6), según Scheidegger, realizada con diversos extractos antigénicos frente al inmunosero anti-PSCA, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

Al estudiar conjuntamente las tablas XXIX y XXXVII, que resumen los resultados del extracto de proteínas solubles de carne de caballo (PSCA), podemos afirmar que, el componente número 2 (movilidad porcentual  $24 \pm 0,73$ ) es el más importante, en relación con la identificación inmunológica de este extracto antigénico, por tratarse de una fracción mayor y no compartida con otras especies animales. También, la número 6 (movilidad porcentual  $64 \pm 0,20$ ) es específica y de carácter glicoprotéico, por lo que puede jugar un papel notable en la identificación de este extracto antigénico.

El extracto antigénico de carne de cerdo presenta seis componentes totales frente al inmunosuero homólogo, de los que cinco, son fracciones comunes con proteínas cárnicas de vaca, caballo, perro y pollo (figura 28).

El antígeno PSC sólo presenta, de acuerdo con nuestros resultados, una sola fracción antigénica (movilidad porcentual  $75 \pm 1,70$ ), que es, al mismo tiempo, un componente mayor. Al tratarse de la fracción más anódica y de que, el componente más próximo tiene una movilidad de  $48 (\pm 0,66)\%$  es relativamente sencillo identificarla en el inmuno-electroferograma y, en consecuencia, será la más importante a la hora de la identificación inmuno-electroforética del PSC.

Los componentes números 1 y 4 son también mayores pero presentan extensas comunidades con los extractos de vaca, caballo, perro y pollo (tabla XXXVIII).

Este inmunosuero anti-PSC, es el único que permite observar arcos de precipitación frente al extracto

TABLA XXXVII

Movilidades porcentuales, en relación a la seroalbúmina bovina, de las fracciones homólogas y heterólogas, de los diversos extractos antigénicos, diferenciados por inmunoelectroforesis en gel de agarosa, según Scheidegger, frente al inmunosuero anti-PSCA, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

Número	Homólogas: Movilidad porcentual	Fracciones antigénicas			
		PSC	PSB	PSP	PSPD
1	12 ( $\pm 1,73$ )	+	+	+	-
2	24 ( $\pm 0,73$ )	-	-	-	-
3	43 ( $\pm 2,00$ )	-	+	-	-
4	51 ( $\pm 2,34$ )	-	+	+	-
5	54 ( $\pm 1,02$ )	-	-	-	-
6	64 ( $\pm 0,20$ )	-	-	-	-
7	97 ( $\pm 0,22$ )	-	-	-	-

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

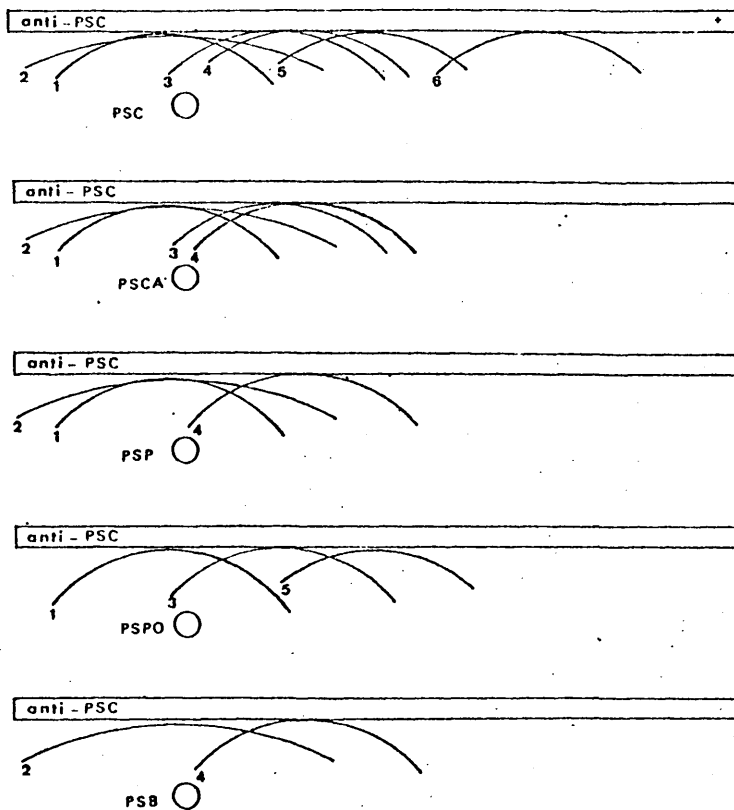


FIG. 28.- Esquema de la inmunolectroforesis en gel de agarosa (pH 8,6), según Scheidegger, realizada con diversos extractos antigénicos frente al inmunosero anti-PSC, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

TABLA XXXVIII

Movilidades porcentuales, en relación a la seroalbúmina bovina, de las fracciones homólogas y heterólogas, de los diversos extractos antigénicos, diferenciadas por inmunoelectroforesis en gel de agarosa, según Scheidegger, frente al suero anti-PSC, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

Número	Homólogas: Movilidad porcentual	Fracciones antigénicas			
		PSC	PSCA	PSP	PSPC
1	16 ( $\pm 0,04$ )	-	+	+	+
2	17 ( $\pm 1,03$ )	+	+	+	-
3	33 ( $\pm 1,32$ )	-	+	-	+
4	37 ( $\pm 1,09$ )	+	+	+	-
5	48 ( $\pm 0,66$ )	-	-	-	+
6	75 ( $\pm 1,70$ )	-	-	-	-

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSCB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSPC: Proteína soluble de carne de pollo.

de carne de pollo. Es posible que ello se deba a que, el grado de inmunización en el conejo, fué más elevado que el conseguido por los demás antígenos.

De las fracciones comunes, las de movilidad 16 ( $\pm 0,04$ ), 17 ( $\pm 1,03$ ) y 37 ( $\pm 1,09$ )%, en relación a la seroalbúmina bovina, aparecen en las proteínas cárnicas de otras tres especies animales, dando lugar, en consecuencia, a importantes problemas en la diferenciación serológica de estas proteínas.

Los resultados obtenidos por inmunolectroforesis al enfrentar al inmunosuero anti-PSP, a los extractos antigénicos heterólogos son muy similares a los conseguidos, previamente, mediante técnicas de inmunodifusión. En ambos casos, se diferenciaron dos fracciones, compartidas con las proteínas cárnicas de cerdo, caballo y vaca (figura 29).

Al estudiar el inmunolectroferograma se observa que, las fracciones números 2 y 5 se repiten en el caballo y vaca y, en el cerdo y caballo, respectivamente. Frente al extracto cárnico de pollo, el resultado es negativo.

De los tres componentes específicos, los de mayor movilidad porcentual (56  $\pm 0,81$  y 97  $\pm 0,23$ ) se encuentran suficientemente alejados de los comunes para que, la técnica de inmunolectroforesis pueda aplicarse a la diferenciación de proteínas, de acuerdo con los resultados obtenidos en este sistema.



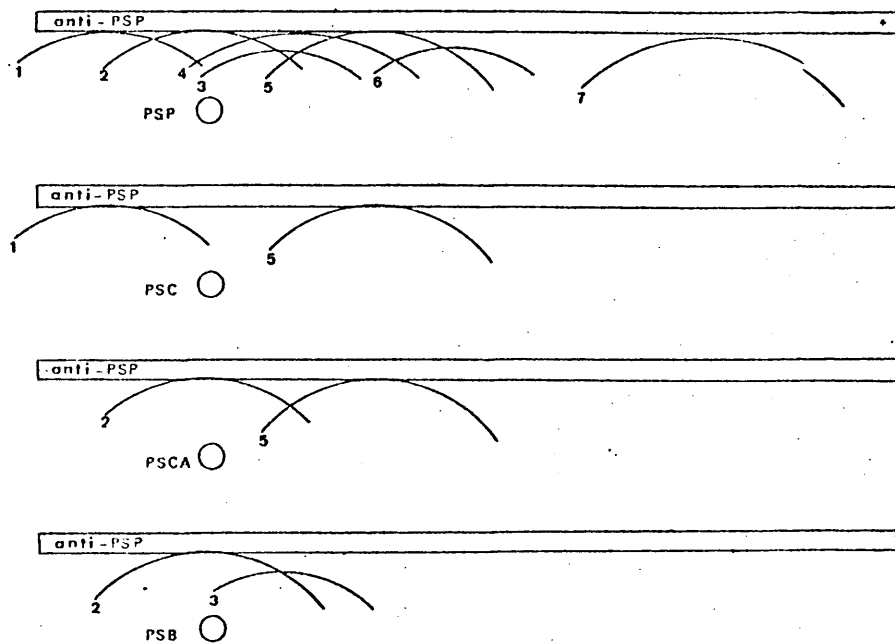


FIG. 29.- Esquema de la inmunoelectroforesis en gel de agarosa (pH 8,6), según Scheidegger, realizada con diversos extractos antigénicos frente al inmunosero anti-PSP, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

En las tablas XXXIII y IXL se observa que, el componente número 7 (movilidad porcentual 97  $\pm 0,23$ ) es mayor, además de específico y, por lo tanto, lo consideramos como el de más interés para identificar el extracto soluble de carne de perro. Menos importancia presenta la fracción número 6 (movilidad porcentual 56  $\pm 0,81$ ) ya que, aunque tiene carácter glicoprotéico es un componente menor, que no aparece hasta los sesenta y dos días de inmunización del conejo.

Al igual que al efectuar las reacciones por inmunodifusión, los resultados de la inmunolectroforesis no han dado ninguna línea de precipitación al enfrentar, el inmunosuero anti-PSPO contra los extractos antigénicos de las demás especies animales.

En este sentido, las seis fracciones detectadas en el sistema homólogo, hemos de considerarlas específicas, al menos, dentro de los límites de nuestra experiencia. De ellas, los componentes números 1, 3 y 6 (tabla XXXV) son además fracciones mayores, que se identifican fácilmente en inmunosueros obtenidos a los doce días de inmunización.

V.F. EXTRACTOS SOLUBLES DE PROTEINAS MUSCULARES, FRENTE A INMUNOSUEROS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS, POR HEMAGLUTINACION PASIVA, SEGUN LEWIS Y KESSEL.

La sensibilidad de la hemaglutinación pasiva es elevada. Chordy y col., (1.962), consiguen títulos de

TABLA IXL

Movilidades porcentuales, en relación a la seroalbúmina bovina, de las fracciones homólogas y heterólogas, de los diversos extractos antigénicos, diferenciados por inmunoelectroforesis en gel de agarosa, según Scheidegger, frente al suero anti-PSP, obtenido por inoculación parenteral en el conejo.

Número	Fracciones antigénicas Homólogas: Movilidad porcentual	Heterólogas			
		PSC	PSB	PSCA	PSPD
1	2 ( $\pm 1,70$ )	+	-	-	-
2	17 ( $\pm 0,10$ )	-	+	+	-
3	29 ( $\pm 0,84$ )	-	+	-	-
4	32 ( $\pm 1,43$ )	-	-	-	-
5	44 ( $\pm 0,99$ )	+	-	+	-
6	56 ( $\pm 0,81$ )	-	-	-	-
7	97 ( $\pm 0,23$ )	-	-	-	-

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

hasta 1/250.000 con antígenos hidatídicos y, Tormo (1.966) hasta 1/10 X  $2^{16}$  con un extracto total salino de Ascaris suum, frente a inmunosueros homólogos obtenidos por inoculación parenteral en el conejo. Es indudable que, estos títulos de hemaglutininas se consiguen a expensas de una disminución de la especificidad. Así, Kagan y col., (1.959), llegan a ajustar la reacción hasta obtener una sensibilidad del 100%, a base de soportar una inespecificidad de 16%. Jung y Pacheco (1.960), con antígenos parasitarios, Ascaris lumbricoides y Toxoscara canis, elevan el título de la hemaglutinación a 1/80, para considerarlo con verdadera significación diagnóstica.

#### V.F.1. Tanización y sensibilización.

Boyden (1.951) señala que, los antígenos de naturaleza protéica se fijan a los hematíes de cordero si, previamente, se han tratado con ácido tánico muy diluido. Chordi y col., (1.962); Keogh y col., (1.948) resaltan que, el empleo de hematíes tanizados es especialmente ventajoso para antígenos de naturaleza protéica.

Un exceso de ácido tánico, provocaría la aglutinación espontánea de los hematíes, apareciendo falsos resultados positivos que, se pondrían de manifiesto, al ser positivos también los controles. Por el contrario, las concentraciones excesivamente bajas de ácido tánico, serían insuficientes para la adecuada tanización de los glóbulos rojos y, determinarían dificultades para su posterior sensibilización con los extractos antigénicos (Pirofski y col., 1.962).

En las tablas XL, XLI y XLII, se puede comprobar la influencia de la dilución del ácido tánico en el título de hemaglutininas, utilizando hematíes sensibilizados con diferentes diluciones del extracto antigénico.

Utilizamos el antígeno procedente de carne de pollo porque presentaba, junto a un elevado título de precipitinas controladas a lo largo del proceso de inmunización, una menor concentración de proteína por mililitro que los demás antígenos.

La sensibilización óptima se consigue, igualmente, a través de pruebas de tanteo, permaneciendo en contacto los hematíes con la suspensión antigénica durante 30 minutos a 37°C. (George y Vaughan, 1.962).

Mantenidas estas condiciones, pudimos ver que, la combinación (tanización/sensibilización) más conveniente era la obtenida con la dilución de ácido tánico 1/40.000 y, el extracto antigénico al 1/5, que permitía títulos positivos con recíprocos de la dilución del inmunosuero anti-PSPO de  $2^{16}$ . La mayor parte de los investigadores, que han empleado esta reacción de hemaglutinación pasiva coinciden en que, diluciones comprendidas entre 1/30.000 y 1/40.000 son las que aportan mejores resultados positivos (Borduas y Grabar, 1.953).

La tanización y sensibilización varían con cada lote de hematíes e incluso con la edad o tiempo de conservación de los glóbulos rojos en el laboratorio. Por ello, en nuestras experiencias, siempre efectuamos esta técnica, con el mismo lote de hematíes, para todos los sistemas antígeno-anticuerpo a estudiar.

TABLA XL

Influencia de la dilución del ácido tánico en el título de hemaglutinación, utilizando hematies sensibilizados con extracto antigénico PSPO al 1/5.

Recíproco de la dilución del inmunosuero anti-PSPO.	Recíproco de la dilución de ácido tánico empleada en el tratamiento de hematies.			
	20.000	30.000	40.000	80.000
2	+	+	+	+
2 <sup>2</sup>	+	+	+	+
2 <sup>3</sup>	+	+	+	+
2 <sup>4</sup>	+	+	+	+
2 <sup>5</sup>	+	+	+	+
2 <sup>6</sup>	+	+	+	+
2 <sup>7</sup>	+	+	+	+
2 <sup>8</sup>	+	+	+	-
2 <sup>9</sup>	+	+	+	-
2 <sup>10</sup>	+	+	+	-
2 <sup>11</sup>	+	+	+	-
2 <sup>12</sup>	-	+	+	-
2 <sup>13</sup>	-	+	+	-
2 <sup>14</sup>	-	+	+	-
2 <sup>15</sup>	-	-	+	-
2 <sup>16</sup>	-	-	+	-
2 <sup>17</sup>	-	-	+	-
2 <sup>18</sup>	-	-	+	-
2 <sup>19</sup>	-	-	-	-
2 <sup>20</sup>	-	-	-	-
Control	-	-	-	-

TABLA XLI

Influencia de la dilución del ácido tánico en el título de hemaglutinación, utilizando hematíes sensibilizados con extracto antigénico PSPG al 1/10.

Recíproco de la dilución del inmunosero anti-PSPG.	Recíproco de la dilución de ácido tánico empleada en el tratamiento de hematíes.			
	20.000	30.000	40.000	80.000
2	+	+	+	+
2 <sup>2</sup>	+	+	+	+
2 <sup>3</sup>	+	+	+	+
2 <sup>4</sup>	+	+	+	+
2 <sup>5</sup>	+	+	+	+
2 <sup>6</sup>	+	+	+	+
2 <sup>7</sup>	+ -	+	+	-
2 <sup>8</sup>	-	+	+	-
2 <sup>9</sup>	-	+ -	+	-
2 <sup>10</sup>	-	-	+	-
2 <sup>11</sup>	-	-	+	-
2 <sup>12</sup>	-	-	+ -	-
2 <sup>13</sup>	-	-	-	-
2 <sup>14</sup>	-	-	-	-
2 <sup>15</sup>	-	-	-	-
2 <sup>16</sup>	-	-	-	-
2 <sup>17</sup>	-	-	-	-
2 <sup>18</sup>	-	-	-	-
2 <sup>19</sup>	-	-	-	-
2 <sup>20</sup>	-	-	-	-
Control	-	-	-	-

185

TABLA XLII

Influencia de la dilución del ácido tánico en el título de hemaglutinación, utilizando hematíes sensibilizados con extracto antigénico PSP0 al 1/20. :

Recíproco de la dilución del inmunosuero anti-PSP0.	Recíproco de la dilución de ácido tánico empleada en el tratamiento de hematíes.			
	20.000	30.000	40.000	80.000
2	+	+	+	+
2 <sup>2</sup>	+	+	+	+
2 <sup>3</sup>	+	+	+	+
2 <sup>4</sup>	+	+	+	+
2 <sup>5</sup>	+	+	+	+
2 <sup>6</sup>	+	+	+	+ -
2 <sup>7</sup>	+	+	+	-
2 <sup>8</sup>	+	+	+	-
2 <sup>9</sup>	+ -	+ -	+	-
2 <sup>10</sup>	-	-	+	-
2 <sup>11</sup>	-	-	+	-
2 <sup>12</sup>	-	-	-	-
2 <sup>13</sup>	-	-	-	-
2 <sup>14</sup>	-	-	-	-
2 <sup>15</sup>	-	-	-	-
2 <sup>16</sup>	-	-	-	-
2 <sup>17</sup>	-	-	-	-
2 <sup>18</sup>	-	-	-	-
2 <sup>19</sup>	-	-	-	-
2 <sup>20</sup>	-	-	-	-
Control	-	-	-	-



#### V.F.2. Sistemas homólogos.

En la tabla XLIII, se comprueba que, los títulos de hemaglutininas más elevados que mantenían los controles negativos, correspondieron a los sistemas realizados con extractos antigénicos procedentes de carne de vaca, caballo y pollo, que consiguieron valores de  $2^{16}$  (figuras 30, 31 y 32) mientras que, para el cerdo y perro sólo se llegó a diluciones cuyos recíprocos eran del orden de  $2^{11}$  y  $2^{10}$  respectivamente (figuras 33 y 34). Karpas y col., (1.970), utilizando esta reacción de hemaglutinación con inmunosueros anti-Ig G de vaca, caballo y cerdo, frente a sueros homólogos, consiguen títulos de hemaglutininas más elevados en los sistemas procedentes de la vaca que en los de origen equino o porcino.

Como esperábamos, los resultados cuantitativos por hemaglutinación pasiva no coinciden con los obtenidos por inmunodifusión radial ya que, según Gordon y col., (1.958), la tasa de hemaglutininas es independiente de la concentración de anticuerpos precipitantes, pudiendo intervenir en la hemaglutinación otros anticuerpos bloqueantes o incompletos, junto a los de carácter precipitante.

#### V.F.3. Sistemas heterólogos.

Los cinco inmunosueros de conejo, preparados por inoculación parenteral de los extractos protéicos solubles de carne de distintas especies, reaccionaron positivamente por hemaglutinación pasiva frente a los anticuerpos heterólogos, con las excepciones de los sistemas PSP anti-PSG y PSPO anti-PSP.

TABLA XLIII

Títulos máximos alcanzados por hemaglutinación pasiva de los extractos antigénicos homólogos frente a los diversos inmunosueros, obtenidos por inoculación parenteral en el conejo.

Inmunosueros	<u>Diluciones de los extractos antigénicos homólogos.</u>		
	1/5	1/10	1/20
anti-PSB	2 <sup>16</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>5</sup>
anti-PSCA	2 <sup>16</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>
anti-PSP	2 <sup>10</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>6</sup>
anti-PSC	2 <sup>11</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>7</sup>
anti-PSPD	2 <sup>16</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>11</sup>

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

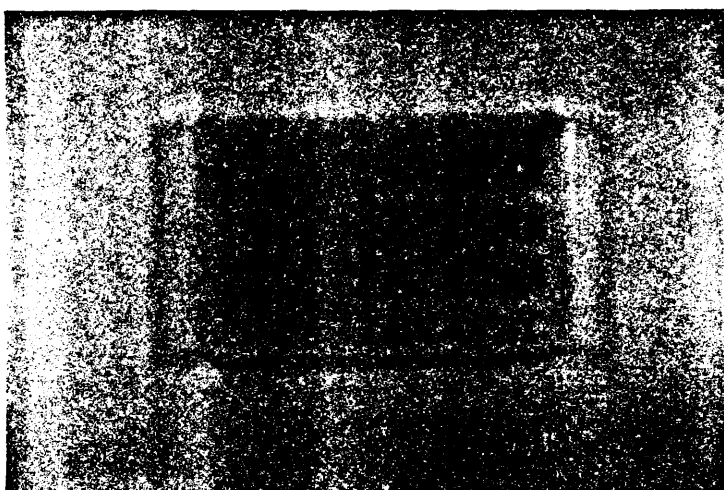


FIG. 20.- Reproducción fotográfica de una placa Perspex, en la que se ha efectuado una prueba de hemaglutinación pasiva, de acuerdo con los siguientes datos: Antígeno PSB (proteína soluble de carne de vaca), inmunosero de conejo anti-PSB y Ácido tánico diluido al 1/40.000.

La fila A corresponde a los controles realizados frente a diluciones sucesivas de suero de conejo normal inactivado.

En las filas B y C, el antígeno se diluyó al 1/5, observándose patrón positivo incluso en la excavación número 16 (título:  $2^{16}$ ). Las filas D y E corresponden al antígeno diluido al 1/10, que permitió obtener un título de  $2^9$ . En las filas F y G, el antígeno fué diluido al 1/20 y el título de hemaglutinación sólo llegó a  $2^5$ .

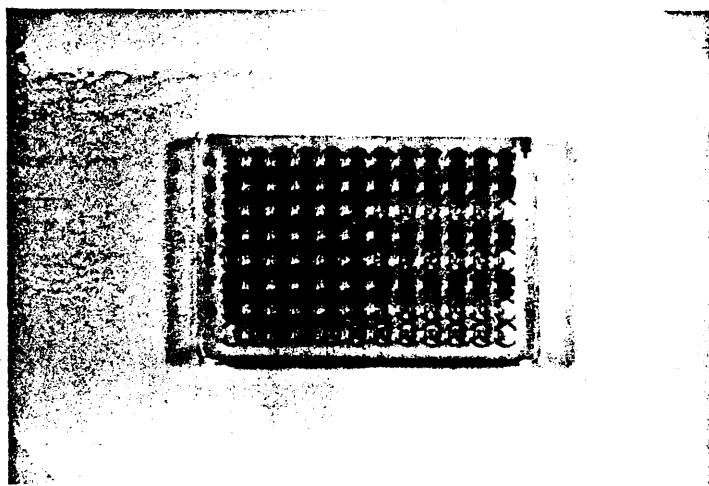


FIG. 31.- Reproducción fotográfica de una placa Perspex, en la que se ha efectuado una prueba de hemaglutinación pasiva, de acuerdo con los siguientes datos: Antígeno PSCA (proteína soluble de carne de caballo), inmunosuero de conejo anti-PSCA y ácido tánico diluido al  $1/40.000$ .

La fila A corresponde a los controles realizados frente a diluciones sucesivas de suero de conejo normal inactivado.

En las filas B y C, el antígeno se diluyó al  $1/5$ , observándose patrón positivo incluso en la excavación número 16 (título:  $2^{16}$ ). Las filas D y E corresponden al antígeno diluido al  $1/10$ , que permitió obtener un título de  $2^8$ . En las filas F y G, el antígeno fué diluido al  $1/20$  y el título de hemaglutinación llegó a  $2^9$ .

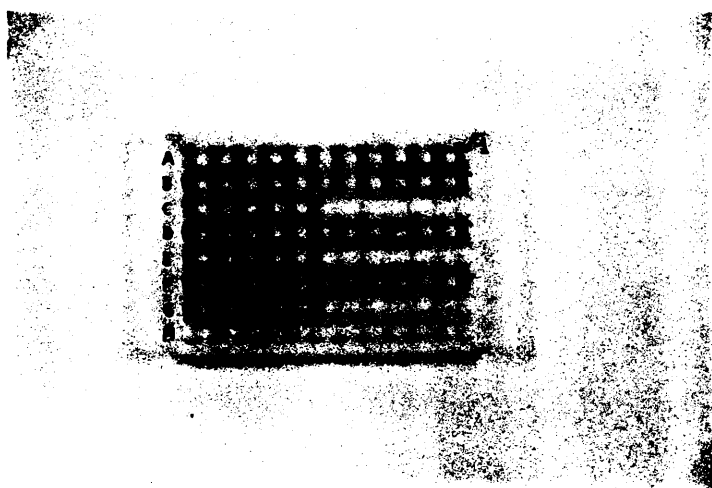


FIG. 32.- Reproducción fotográfica de una placa Perspex, en la que se ha efectuado una prueba de hemaglutinación pasiva, de acuerdo con los siguientes datos: Antígeno PSPO (proteína soluble de carne de pollo), inmunosero de conejo anti-PSPO y ácido tánico  $1/40.000$ .

La fila A corresponde a los controles realizados frente a diluciones sucesivas de suero de conejo normal inactivado.

En las filas B y C, el antígeno se diluyó al  $1/5$ , observándose patrón positivo incluso en la excavación número 16 (Título:  $2^{16}$ ). Las filas D y E corresponden al antígeno diluido al  $1/10$ , que permitió obtener un título de  $2^{11}$ . En las filas F y G, el antígeno fué diluido al  $1/20$  y el título de hemaglutinación fué también de  $2^{11}$ .

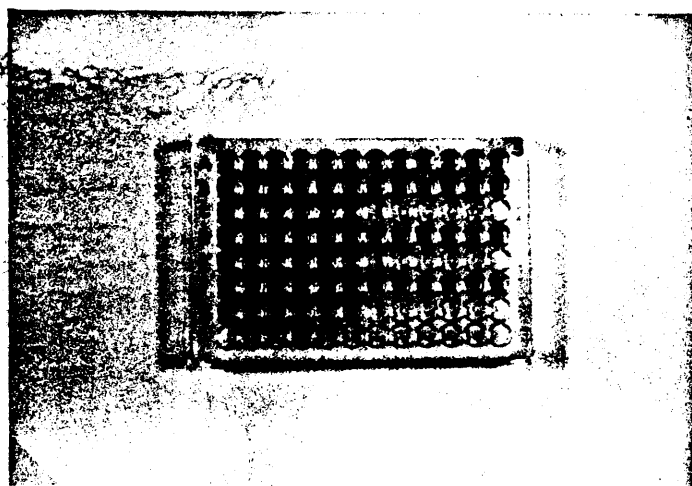


FIG. 33.- Reproducción fotográfica de una placa Perispex, en la que se ha efectuado una prueba de hemaglutinación pasiva, de acuerdo con los siguientes datos: Antígeno PSC (proteína soluble de carne de cerdo), inmunosuero de conejo anti-PSC y ácido tánico diluido al 1/40.000.

La fila A corresponde a los controles realizados frente a diluciones sucesivas de suero de conejo normal inactivado.

En las filas B y C, el antígeno se diluyó al 1/5, observándose patrón positivo en la excavación número 11 (título:  $2^{11}$ ). Las filas D y E corresponden al antígeno diluido al 1/10, que permitió obtener un título de  $2^9$ . En las filas F y G, el antígeno fué diluido al 1/20 y el título de hemaglutinación llegó a  $2^7$ .

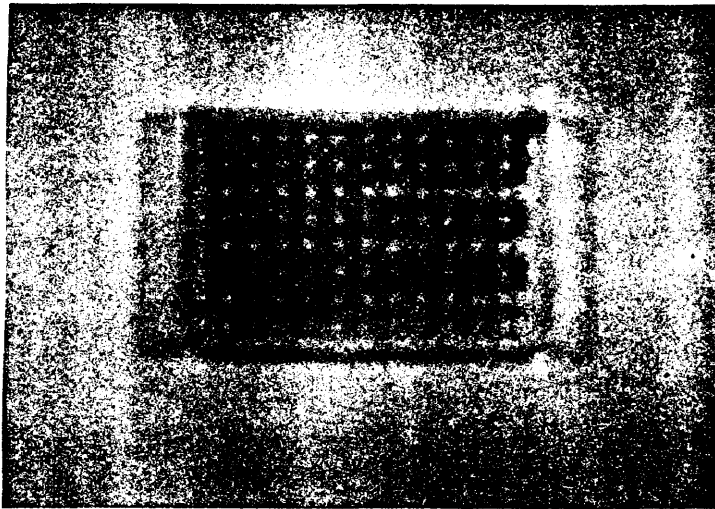


FIG. 34.- Reproducción fotográfica de una placa Perspex, en la que se ha efectuado una prueba de hemaglutinación pasiva, de acuerdo con los siguientes datos: Antígeno PSP (proteína soluble de carne de perro), inmunosuero de conejo anti-PSP y ácido ténico diluido al 1/40.000.

La fila A corresponde a los controles realizados frente a diluciones sucesivas de suero de conejo normal inactivado.

En las filas B y C, el antígeno se diluyó al 1/5, observándose patrón positivo incluso en la excavación número 10 (título:  $2^{10}$ ). Las filas D y E corresponden al antígeno diluido al 1/10, que permitió obtener un título de  $2^7$ . En las filas F y G, el antígeno fué diluido al 1/20 y el título de hemaglutinación llegó a  $2^6$ .

Así, en la tabla XLIV, el inmunosuero anti-PSB dió un título de  $1/2^9$  contra el extracto cárnico de caballo y, sensiblemente menores,  $1/2^5$ ,  $1/2^4$  y  $1/2^3$  para el cerdo, pollo y perro. Ya que, el título obtenido frente al antígeno homólogo fué de  $1/2^{16}$ , creemos que es preciso conseguir niveles de hemaglutininas superiores al menos a  $1/2^{10}$ , para considerar que, en el extracto cárnico hay proteínas solubles homólogas y que, por lo tanto, la reacción tiene carácter específico. Karpas y col., (1.970), empleando inmunosueros anti-Ig G de vaca, obtiene resultados negativos por hemaglutinación frente a un suero equino, porcino y de pollo. De confirmarse estos resultados, sería posible pensar que, las fracciones antigénicas inespecíficas, responsables del título de hemaglutininas en las reacciones heterólogas, estarían ligadas a las proteínas solubles cárnicas o a proteínas séricas, ajenas a la Ig G.

Como se comprueba en la tabla XLV, el título más elevado en una reacción de hemaglutinación heteróloga se obtiene también entre proteínas de caballo y vaca, bien entendido que, en este caso, el sistema es inverso, o sea, PSB anti-PSCA. Empleando este inmunosuero y, en el límite de nuestras experiencias, sería preciso también, un título cuyo recíproco no fuese inferior a  $2^{10}$ , para dar verdadera significación diagnóstica a la reacción de hemaglutinación pasiva.

Frente al inmunosuero anti-proteínas solubles de carne de cerdo, los títulos correspondientes a las reacciones de hemaglutinación pasiva heterólogas han sido más



TABLA XLIV

Título máximo obtenido por hemaglutinación pasiva de los hematíes sensibilizados al 1/5 con los diversos extractos antigénicos, frente al inmunosuero anti-PSB.

Hematíes sensibilizados con:	Recíproco de la dilución del inmunosuero.	Control
PSPD	2 <sup>4</sup>	-
PSP	2 <sup>3</sup>	-
PSCA	2 <sup>9</sup>	-
PSC	2 <sup>5</sup>	-

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

TABLA XLV

Título máximo obtenido por hemaglutinación pasiva de los hematíes sensibilizados al 1/5 con los diversos extractos antigénicos, frente al inmunosuero anti-PSCA.

Hematíes sensibilizados con:	Recíproco de la dilución del inmunosuero.	Control
PSPD	$2^3$	-
PSP	$2^3$	-
PSB	$2^9$	-
PSC	$2^3$	-

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

bajos y, en algunos casos (PSP), incluso negativos (tabla XLVI). Karpas y col., (1.970) trabajando con un inmunosuero anti-Ig G porcino, sólo consiguen un título de orden superior, entre el antígeno homólogo y el de procedencia bovina. En nuestro trabajo, el título detectado para el extracto cárnico de cerdo es  $1/2^{11}$  y desciende a  $1/2^7$  para el de vaca. En consecuencia, niveles de anticuerpos que representen recíprocos del título superiores a  $2^8$ , tendrían capacidad diferenciadora o, lo que es lo mismo, significación diagnóstica.

Hemos visto, al analizar los sistemas homólogos, que el extracto cárnico de perro (PSP) permite llegar a diluciones de  $1/2^{10}$ , frente al inmunosuero anti-PSP. En la tabla XLVII, se recogen los resultados de las pruebas de hemaglutinación, correspondientes a los sistemas heterólogos. Los títulos más próximos se dan con los antígenos de procedencia bovina y porcina, siendo negativas las reacciones frente al extracto de pollo.

Las diferencias más marcadas entre los títulos de hemaglutinación, correspondientes a los sistemas homólogos y heterólogos se obtuvieron con el inmunosuero anti-proteínas solubles de carne de pollo (tabla XLVIII). Dentro del límite de nuestro trabajo, recíprocos del orden de  $2^5$  o superiores, pueden ser significativos a la hora de considerar la reacción como específica. Es posible, que este mayor grado de diferenciación, detectable cuantitativamente, tenga como base, el distinto origen y clasificación zoológica entre aves y mamíferos.

TABLA XLVI

Título máximo obtenido por hemaglutinación pasiva de los hematíes sensibilizados al 1/5 con los diversos extractos antigénicos, frente al inmunosuero anti-PSC.

Hematíes sensi- bilizados con:	Recíproco de la dilu- ción del inmunosuero.	Control
PSPD	$2^2$	-
PSCA	$2^6$	-
PSP	-	-
PSB	$2^7$	-

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

TABLA XLVII

Título máximo obtenido por hemaglutinación pasiva de los hematíes sensibilizados al 1/5 con los diversos extractos antigénicos, frente al inmunosuero anti-PSP.

Hematíes sensi- bilizados con:	Recíproco de la dilu- ción del inmunosuero.	Control
PSC	2 <sup>5</sup>	-
PSCA	2 <sup>6</sup>	-
PSPD	-	-
PSB	2 <sup>6</sup>	-

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

TABLA XLVIII

Título máximo obtenido por hemaglutinación pasiva  
de los hematíes sensibilizados al 1/5, con los diversos  
extractos antigénicos, frente al inmunosuero anti-PSPD.

Hematíes sensi- bilizados con:	Recíproco de la dilu- ción del inmunosuero.	Control
PSCA	2 <sup>4</sup>	-
PSC	2 <sup>2</sup>	-
PSP	2	-
PSB	2 <sup>4</sup>	-

PSPD: Proteína soluble de carne de pollo.

PSCA: Proteína soluble de carne de caballo.

PSC: Proteína soluble de carne de cerdo.

PSP: Proteína soluble de carne de perro.

PSB: Proteína soluble de carne de vaca.

Sería de interés completar estas experiencias realizando pruebas de hemaglutinación pasiva con extractos antigénicos, preparados por homogeinización de una mezcla de carnes de diferentes especies. De este modo, sería posible comprobar si, se elevaba el título en las reacciones heterólogas, al ser mayor el número de componentes antigénicos presentes o sí, por el contrario, el nivel de anticuerpos detectados por la reacción, permanecía invariable.

Una vez considerados los resultados del análisis cualitativo de los extractos cárnicos, por inmunodifusión e inmunolectroforesis, es posible llegar a considerar que, el alto porcentaje de inespecificidades, detectadas por hemaglutinación pasiva, obedece más a las estrechas comunidades demostradas que a las características propias de la reacción.

En consecuencia, pensamos que resultaría más correcto utilizar en la hemaglutinación pasiva, extractos antigénicos más específicos, o sea, preparados en los que se hubiesen eliminado las fracciones comunes entre las diferentes especies animales, que emplear extractos totales y elevar el título de la reacción cuantitativa hasta un nivel de verdadera significación diagnóstica.

## CONCLUSIONES



## CAPITULO VI.

### CONCLUSIONES.

1a) Utilizando en todos los casos adyuvante completo de Freund, el proceso de hiperinmunización del conejo, fué más eficaz con el extracto antigénico de proteína soluble de carne de cerdo (PSC), que con los demás extractos inoculados. La respuesta más baja de precipitinas se obtuvo con los antígenos procedentes de carne de caballo y vaca (PSCA y PSB, respectivamente).

2a) Consideramos que únicamente las bandas con valores densitométricos altos (superiores al 25%), sirven para la diferenciación de proteínas solubles cárnicas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

3a) El número máximo de componentes antigénicos diferenciados por inmunodifusión en gel de agarosa se alcanzó en los sistemas homólogos, con extractos antigénicos diluidos al 1/2 (24 mg. de polvo liofilizado por ml.), mientras que en los heterólogos, el número máximo de fracciones se obtuvo con el antígeno no diluido, excepto cuando las pruebas se realizaron frente al suero anti-PSP.

4a) El elevado porcentaje de reacciones cruzadas y positivas falsas, que presentan las pruebas convencionales de precipitación en tubo, en la diferenciación de

extractos cárnicos procedentes de diversas especies animales, se debe, en nuestra opinión, a las amplias comunidades e incluso identidades antigénicas de los extractos protéicos analizados por inmunodifusión e inmunoelectroforesis, con la excepción del inmunosuero anti-PSPO, que no reaccionó frente a los antígenos heterólogos.

5a) En las condiciones de nuestra experiencia, los resultados de la inmunodifusión radial nos han permitido diferenciar los sistemas homólogos de los heterólogos, correspondientes a los extractos antigénicos cárnicos de las especies animales estudiadas.

6a) La caracterización inmunoquímica de las fracciones inmunoelectroforéticas ha hecho posible la diferenciación de los componentes glicoprotéicos de los extractos solubles de la carne de caballo, cerdo, perro y pollo, y los lipoprotéicos, solamente, de la última especie citada.

7a) Por inmunoelectroforesis, en gel de agarosa, hemos identificado los componentes mayores y de carácter específico, cuyas movilidades electroforéticas porcentuales, en relación a la seroalbúmina bovina, son las siguientes:

PSB: 31 y 40

PSCA: 24

PSC: 75

PSP: 97

PSPO: 17, 44 (lipoproteína) y 85.

8a) Consideramos que, la preparación de extractos antigénicos con las fracciones mayores y específicas, citadas en la conclusión anterior y, exentos de los componentes comunes e inespecíficos, facilitaría extraordinariamente, la diferenciación inmunológica de las carnes, basada en las reacciones de precipitación.

9a) La sensibilidad de la hemaglutinación pasiva, para los sistemas antígeno-anticuerpo estudiados en nuestro trabajo, era máxima cuando los hematíes se trataban con ácido tánico al 1/40.000 y el extracto antigénico al 1/5 (9,6 mg. de polvo liofilizado por ml.).

10a) De acuerdo con los resultados obtenidos con la reacción de hemaglutinación pasiva y, dentro de los límites de nuestra experiencia, consideramos que, los recíprocos de los títulos mínimos de hemaglutininas que tienen significación específica son de  $2^{10}$  para los extractos cárnicos de vaca y caballo, de  $2^8$  para el cerdo, de  $2^7$  para el perro y de  $2^5$  para el pollo.

#### BIBLIOGRAFIA

CAPITULO VII.BIBLIOGRAFIA.

- ANDERSEN, N.G., (1.968): Quart. Rev. Biophys., 1, 217.
- ANTOINE, B., (1.962): Science, 138, 977.
- ARAKI, C., (1.937): J. Chem. Soc. Japan, 58, 1.138.
- ARRHENIUS, S., (1.907): Immunochemistry, (Mac Millan, N.Y.).
- AUGENER, W., (1.964): Protides Biol. Fluids., 12, 363.
- BAUER, K., (1.969): Hum. Genet., 7, 76.
- BENFDICT, A.A., BROWN, R.J. y AYENGER, R., (1.962): J. Exp. Med. 115, 195.
- BERENBAUM, M.C., KITCH, G.M. y COPE, W.A., (1.962): Nature, 193, 81.
- BERG, T., (1.969): Acta Paediat. Scand., 58, 229.
- BERG, T. y JOHANSSON, S.G.O., (1.969): Acta Paediat. Scand., 58, 513.
- BIER, M., (1.959): En "Electrophoresis". Academic Press. New York.
- BJORKLUND, B. y PAULSSON, J.E., (1.962): J. Immunol., 89, 759.
- BOLTON, A.E. y HUNTER, W.M., (1.973): Biochim. Biophys. Acta., 329, 318.
- BORDET, J., (1.899): Annls. Inst. Pasteur., 13, 225.
- BORDUAS, A.G. y GRABAR, P., (1.953): Annls. Inst. Pasteur., 84, 903.
- BOYDEN, A. y NOBLE, G.K., (1.933): Ann. Mus. Novit., 606, 1.
- BOYDEN, A., (1.942): Physiol. Zool., 15, 109.

- BOYDEN, S.V., (1.951): J. Exp. Med., 93, 107.
- BRECHT, H., (1.948): J. Immunol., 101, 18.
- BRUCHIERI, A. y GRASSO, S., (1.966): Boll. Soc. It. Biol. Sper., 43, 1.105.
- BUCHANAN-DAVIDSON, D.J. y OUDIN, J., (1.958): J. Immunol. 81, 484.
- BURNET, F.M. y ANDERSON, S.G., (1.946): Brit. J. Exp. Path. 27, 236.
- BURNET, F.M., KEOGH, E.V. y LUSH, D., (1.937): Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., 15, 231.
- BURTIN, P., (1.954): Bull. Soc. Chim. Biol., 36, 1.021.
- CAUMON, C. y KRESSMAN, T.R.F., (ed.) (1.957): "Ion Exchangers in organic and Biochemistry". Interscience. New York.
- CAMPBELL, D.H., LUCHER, E. y LERMAN, I.S., (1.951): Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 37, 575.
- CARPENTER, P.L., (1.975): "Immunology and Serology". 3ª ed. Saunders W.B. (ed.). Filadelfia.
- CAWLEY, L.P., (1.969): "Electrophoresis and Immunoelectrophoresis". Little Brown. Boston.
- CHAMPION, A., PARSONS, A.L. y LAWRIE, R.A., (1.970): J. Sci. Food. Agric., 21, 7.
- CHANCE, A. y REDFEARN, J., (1.961): Biochem. J., 80, 632.
- CHARLWOOD, P.A. y GORDON, A.H., (1.958): Biochem. J., 70, 433.
- CHARPENTIER, J. y GOUTEFONGEA, R., (1.963): Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 3, 381.
- CHORDI, A. y KAGAN, I.G., (1.964): J. Immunol., 93, 439.
- CHORDI, A., GONZALEZ-CASTRO, J., TORMO, J. y DIAZ, R. (1.962): Rev. Med. Universidad de Navarra., 6, 27.

- CHU, R., (1.968): J.Ass. Agr. Chem., 51, 754.
- CHUA, N.H. y BLOMBERG, F., (1.979): J. Biol. Chem., 254, 215.
- CLAUSEN, J. y HEREMANS, J., (1.960): J. Immunol., 84, 128.
- CLAUSEN, J., (1.963): Sci. Tools., 10, 29.
- CLAUSEN, J., (1.969): "Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules". North-Holland. Publis. London.
- CODURI, R.J. y RAND, A.G., (1.972): J. of the A.O.A.C., 55, 461.
- COHN, E.J. y FDSSALL, J.T., (1.941): "Proteins, Amino acids and Peptides. (Reinhold, ed.). New York.
- COLLINS, W.P. y HENNAN, J.F., (1.976): "Molecular aspects of Medicine". (Baum, H.I. y Gergely, J., eds.). Pergamon. Oxford.
- CONVERSE, C.A. y PAPERMASTER, D.S., (1.975): Science, 189, 469.
- COOMBS, R.R.A., HOWARD, A.N. y MYNORS, L.S., (1.953): Brit. J. Expt. Path., 34, 525.
- COURT, G. y HUPN, B.A.L., (1.971): "Radioimmunoassay methods". (Kirkhan, K. y Hunter, W.M. eds.). Edimburgo.
- CRAIG, L.C. y KING, T.P., (1.955): J.Am. Soc. Chem., 77, 6620.
- CRAIG, L.C., KING, T.P. y STRACHER, A., (1.957): J. Am. Chem. Soc., 32, 10.
- CROWLE, A.J., (1.961): "Immunodiffusion". Academic Press. New York.
- CUTRECHASAS, P. y ANFINSEN, C.B., (1.971): Ann. Rev. Biochem., 40, 259.
- DAVIDSON, F. y HENRY, J.B., (1.978): "Clinical diagnosis by laboratory methods". (Saunders, W.B. eds.). Filadelfia.
- DAWF, D.L., SFGRE, D. y MYERS, W.L., (1.965): Science, 148, 1.345.

- DESCHREIDER, A.R. y MEAUX, R., (1.974): Indust. Aliment. et Agric., 91, 101.
- DEUTSH, H.F. y GOODLOE, M.B., (1.945): J. Biol. Chem., 161, 1.
- DRAY, S., (1.960): Science, 132, 1.313.
- DUNKER, A.K. y RUECKERT, R.R., (1.969): J. Biol. Chem., 224, 5.074.
- EDELMAN, G.M., HERFMANS, J.M., HERFMANS, M.T. y KUNKEL, H. G., (1.960): J. Exptl. Med., 112, 203.
- EKWALL, K., SODERHOLM, J. y WADSTROM, T., (1.976): J. Immunol. Methods, 12, 103.
- FAMCETT, J.S. y MORRIS, C.J.O.R., (1.966): Separation Studies, 1, 9.
- FEHON, F.J. y SCOTT, L.V., (1.961): J. Immunol., 86, 42.
- FEINBERG, J.G., (1.959): Shandon Scientific, Co. London.
- FLEGO, L., (1.976): Bolletino dei Chimici dei Laboratori Provinciali, 27, 99.
- FRICK, F. y SCHEIDSEIDEL, L., (1.957): Z. Ges. Exptl. Med., 122, 221.
- FUDENBERG, H., DREWS, G. y NISONOFF, A., (1.964): J. Exptl. Med., 119, 151.
- FUGATE, H.G. y SHELTON, R., (1.971): J. of the A.O.A.C., 54, 1.152.
- FUJIMAKI, M. y DEATHERAGE, F.E., (1.964): J. Food. Sci., 23, 159.
- FULLERTON, P.M. y BARNES, J.M., (1.966): Brit. J. Ind. Med., 23, 590.
- FULTHORPE, A.J., (1.962): Immunology, 5, 30.



- GARVEY, J.S., CREEMER, N.E. y SUSSDORF, D.H., (1.977): "Methods in Immunology". Benjamin M.A. Inc. Massachussetts.
- GARTNER, A., (1.922): "Outlines of Biochemistry". John Wiley and sons. Inc. New York.
- GELOTTE, R., (1.960): J. Chromatography, 3, 330.
- GEORGE, M. y VAUGHEN, J.H., (1.962): J. Immunol., 88, 191.
- GONZALEZ-CASTRO, J. y RODRIGUEZ-BURGOS, A., (1.961): Rev. Iber. de Parasitología, 21, 2.
- GOODMAN, M., (1.962): Human Biol., 34, 104.
- GOODNER, K., (1.941): Science, 94, 241.
- GORDON, J., ROSE, B. y SFHON, A.H., (1.958): J. Exptl. Med., 108, 37.
- GORDON, A.H. y LOUIS, L.N., (1.967): Anal. Biochemistry, 21, 190.
- GRABAR, P. y WILLIAMS, C.A., (1.953): Biochim. Biophys. Acta, 10, 193.
- GRABAR, P., CORRCON, J., ILBERG, P.L.T., LOUIT, J.F. y MERRILL, L.P., (1.955): Compt. Rend., 245, 950.
- GRABAR, P., (1.958): Advances Protein Chem., 13, 133.
- GRABAR, P. y BURTIN, P., (1.964): "Immunoelectrophoretic analysis". Elsevier (ed.). Amsterdam.
- GRATZER, W.B. y BEAVEN, G.H., (1.961): J. Chromatog., 5, 315.
- GYENES, L. y SFHON, A.H., (1.964): Immunochemistry, 1, 43.
- HACKENBROCK, C.R. y HAMMON, K.M., (1.975): J. Biol., 250, 185.
- HARRIS, H.m ROBSON, E.B. y SINISCALCO, M., (1.956): Arch. Biochem., 65, 427.

HEIDELBERGER, M. y KENDALL, F.E., (1.929): J. Exper. Med., 52, 809.

HEIDELBERGER, M. y KABAT, E.A., (1.937): J. Exper. Med., 65, 885.

HEIDELBERGER, M., (1.939): Bact. Rev., 3, 49.

HELLER, G., JACOBSON, A.S., KOLODNY, M.H. y SCHUMAN, R.L., (1.952): J. Immunol., 69, 27.

HENRY, R.J., (1.964): "Clinical chemistry: Principles and techniques". Hoeber Medical, Division. New York.

HEREMANS, J.F., (1.971): "Methods in immunology and immunochemistry". Academic Press. New York.

HERRMANN, C. y KOTLER, I., (1.968): Arch. Lebensmittelhyg., 12, 266.

HILL, W.S., LEARSON, R.J., LANE, B.P., (1.966): J. Ass. Offic. Agr. Chem., 49, 1.245

HIRATA, A.A. y STASHAK, P.W., (1.965): Nature, 205, 1.233.

HOWER, P.E., (1.921): J. Biol. Chem., 49, 93.

HOYEM, T. y THORSON, B., (1.970): J. Agric. Food Chem., 18, 737.

HUMPHREY, J.H., (1.963): "Tolerance acquise et tolerance naturelle á l'Egard de substances antigeniques définies". Centre National de la recherche Scientifique. Paris.

HUNTER, W.M., GRRFWOOD, F.C., (1.962): Nature, 194, 495.

HUNTER, W.M., (1.967): "Handbook of experimental immunology". (Wwie, B., ed.). Blackwell. Oxford.

INGRAHAN, J.S., (1.958): Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., 99, 452.

ISHIZAKA, T., CAMPBELL, D.H. e ISHIZAKA, T., (1.960): Proc.

Soc. Exptl. Biol. Med., 103, 5.

JANDL, J.H. y SIMMONS, R.L., (1.957): J. Haemat., 3, 19.

JENNINGS, R.K., (1.956): J. Immunol., 77, 156.

JENNINGS, R.K. y KAPLAN, M.A., (1.960): Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 17, 267.

JERNE, N.K. y SKOVSTED, L., (1.953): Annls. Inst. Pasteur., 84, 73.

YOUNG, R.C. y PACHECO, G., (1.960): Am. J. of Trop. Med. and Hyg., 9, 185.

KABAT, E.A. y MAYERS, M.M., (1.971): "Experimental immuno-chemistry". Charles Thomas Publ. Illinois.

KAGAN, I.G., JESKA, E.L. y GENTZKOW, C.J., (1.958): J. of Immunol., 80, 400.

KAGAN, I.G., NORMAN, L. y ALLAIN, D.S., (1.959): J. Immunol., 83, 297.

KAMINSKI, M. y NOUVELL, J., (1.952): Bull. Soc. Chim. Biol. Suppl., 1, 85.

KAMINSKI, M., (1.955): Notes techniques Ministère de l'air, 52, 69. Paris.

KAMINSKI, M., (1.957): Bull. Soc. Chim. Biol., 39, 85.

KARPAS, A.B., MYERS, W.L. y SEGRE, D., (1.970): J. of Food Sci., 35, 150.

KATSUBE, Y. e IMAIZUMI, K., (1.966): J. Exp. Vet. Med. Ass., 19, 470.

KENDALL, F.E., (1.941): J. Biol. Chem., 138, 97.

KEOGH, E.V., NORTH, E.A. y WARBURTON, M.E., (1.948): Nature, 161, 687.

KEUTEL, H.J., (1.964): Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 484.

- KOHN, J., (1.958): Clin. Chim. Acta, 3, 450.
- KROHRN, K.A., KNIGHT, L.C. y HERWING, J.F., (1.977): Biochim. Biophys. Acta, 490, 497.
- KUNIN, R. (1.958): "Ion exchange resins". (John Wiley ed.). New York.
- LAPRESLE, C., (1.955): Annls. Inst. Pasteur, 89, 654.
- LAPRESLE, C. y GRABAR, P., (1.957): Rev. Franc. études clin. Biol., 2, 1.025.
- LATHE, G.H. y RUTHVEN, C.R.J., (1.956): Biochem. J., 62, 654.
- LECOCQ, F. y LINZ, R., (1.962): Annls. Inst. Pasteur, 102, 437.
- LEFF, Y.B., RICHANSRUD, D.A. y HAGBERG, F.C., (1.970): J. Food Sci., 33, 428.
- LEGGITT, J., (1.962): "Techniques in protein chemistry". (Elsevier ed.). Amsterdam.
- LEHNINGER, A.L., (1.978): "Biochemistry". Worth Pbls. Inc. New York.
- LEWIS, W.P. y KESSEL, J.S., (1.961): Arch. Ophthalm., 66, 471.
- LING, N.R., (1.961): Immunology, 4, 49.
- LING, N.R., (1.961): Brit. J. Haemat., 7, 299.
- LINZ, R. y LECOCQ, F., (1.962): Annls. Inst. Pasteur, 102, 92.
- LOFT, H., (1.975): Scand. J. Immunol., 4 suppl. 2, 115.
- LOMANTO, B. y VERGANI, C., (1.967): Clin. Chim. Acta, 15, 169.
- LUNDAHL, P. y LILJAS, L., (1.975): Anal. Biochem., 65, 50.
- MACKIE, I.M., (1.968): Analyst., 93, 458.
- MANCINI, G., WAERMAN, J.P., CARBONFRA, A.O. y HEREMANS, J.F. (1.964): "Protides of the biological fluids". (H. Peeters, ed.). Amsterdam.

- MANCINI, G., CARBONERA, A.O. y HEREMANS, J.F., (1.965): Immunochemistry, 2, 235.
- MANCINI, G., NASH, D.R. y HEREMANS, J.F., (1.970): Immunochemistry, 7, 261.
- MANUSCO, V.M., (1.964): J. Ass. Offic. Agr. Chem., 47, 5.
- MARRACK, M., (1.938): "The chemistry of antigens and antibodies". Her Majesty's Stationery Office. London.
- MAURER, P.H., GERULAT, B.F. y PINCHUCK, P., (1.963): J. Immunol., 90, 381.
- MAYER, R.J. y WILKER, J.H., (1.980): "Immunochemical methods in Biological Sciences: Enzymes and Proteins". Academic Press. New York.
- MOORE, D.H., (1.245): J. Biol. Chem., 161, 21.
- MORRIS, C.J.O.R. y MORRIS, P., (1.964): "Separations methods in Biochemistry". Pitman Ltd. London.
- MUÑOZ, J., (1.971): "Methods in Immunology and Immunochemistry". Academic Press. New York.
- MURAKAMI, H., UMEKI, F., NAKAMURA, T. y HARUTA, M., (1.969): J. Food Hyg. Soc., 10, 434.
- NASH, D.R., SCOLARI, L. y HEREMANS, J.F., (1.970): Immunochemistry, 7, 265.
- NERNBERG, S.T., (1.972): "Electrophoresis: A practical laboratory manual". Blackwell Scientifics Publ. Oxford.
- NIFCE, J.L. y BARRETT, J.T., (1.963): Nature, 197, 1.021.
- NUTTALL, G.H.F., (1.904): "Food immunity and food relationship". University Press. Cambridge.
- OHTSUKI, K., (1.975): J. Biochem., 77, 663.
- OLIVER-GONZALEZ, J., (1.946): J. of Infect. Dis., 79, 221.

- OUCHTERLONY, O., (1.949): Arkiv. Kemi., 1, 43.
- OUCHTERLONY, O., (1.949): Acta Pathol. Microbiol. Scand., 26, 507.
- OUCHTERLONY, O., (1.962): "Diffussion in gel methods for immunological analysis". II Progr. Allergy VI.
- OUCHTERLONY, O., (1.967): "Handbook of experimental immunology". (B. Weir ed.). Blackwell. Oxford.
- OUCHTERLONY, O., (1.968): "Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis". Ann. Arbor Science Pbl.
- ODIN, J., (1.946): Compt. Rend., 222, 115.
- PARKER, W.C., HAGTROM, J.W.C. y BEARN, A.G., (1.963): J. Exptl. Med., 118, 975.
- PATTE, J.C., BALDASSAIRE, G. y LORET, J., (1.958): Rev. Franc. et Clin. Biol., 3, 960.
- PAUL, W.F. y BENACERRAF, B.J., (1.966): I. Immunol., 95 1.067.
- PAULING, P., (1.948): Endeavour, 7, 26.
- PEREIRA, H.G., ALLISON, A.C. y FARTHING, C.P., (1.959): Nature, 183, 895.
- PERT, J.H. y PINTERIC, L., (1.964): Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 310.
- PETERSON, E.A. y SOBER, H.A., (1.956): I. Am. Chem. Soc., 78, 751.
- PETROPAKIS, H.J., MONTGOMERY, M.W., DAVIDSON, W.D. y ANGLEMIER, A. F., (1.969): J. Inst. Can. Technol. Aliment., 2, 108.
- PIGMAN, W., GRANLING, F. y HOLLEY, H.L., (1.961): Biochim. Biophys. Acta, 46, 100.

- PIROFSKI, B., CORDOVA, M. e IMEL, T.L., (1.962): J. Immunol., 82, 767.
- PORTER, R.R., (1.966): Brit. Med. Bull., 22, 164.
- POULIK, M.D., (1.952): Can. J. Med. Sci., 30, 417.
- POULIK, M.D., (1.957): Nature, 180, 1.477.
- POULIK, M.D., (1.958): Federation Proc., 17, 530.
- POULIK, M.D. y SMITHIES, O., (1.958): Biochem. J., 68, 636.
- POYTON, R.O. y SCHATZ, G., (1.975): J. Biol. Chem., 250, 762.
- PRAGER, E.M. y WILSON, A.C., (1.971): J. Biol. Chem., 246, 5.978.
- PRESSMAN, D., CAMPBELL, D. H. y PAULING, L., (1.942): J. Immunol., 44, 101.
- PROOM, H., (1.953): J. Pathol. Bact., 55, 419.
- RAMDASS, P. y MISRA, D.S., (1.974): Indian J. Anim. Sci., 44, 844.
- RAMPON, J.F., ANGLEMIER, A.F. y MONTGOMERY, M.W., (1.965): J. Food Sci., 30, 636.
- RANGEL, H., (1.965): Immunology, 8, 88.
- REICHERT, E.T. y BROWN, A.P., (1.909): Publs. Carnegie Inst. n° 116.
- REICHLIN, M., HAY, M. y LEVINE, L., (1.964): Immunochimistry, 1, 21.
- REINHOLD, J.G., (1.953): "Standard methods of Clinical Chemistry". vol. 1. (Reiner M. ed.) Academic Press, Inc., New York.
- RITZMANN, B., HOPKEN, W. y MAYER, M.M., (1.958): J. Immunol., 80, 386.

- RITZMANN, S.F. y LEVIN, W.C., (1.969): "Lab synopsis". vol. 2. 2nd. (Blehring Diagnostics ed.) Inc. New York.
- ROBERTS, R. y PAINTER, A., (1.977): Biochim. Biophys. Acta, 480, 521.
- ROWE, D.S., (1.963): Bull. Wild. Hlth. Org., 40, 613.
- RUMKE, P.H. y THUNG, P.J., (1.964): Acta Endocrinol., 47, 156.
- RUMKE, P. y BEEKVELDT-KIEFICH, J.C., (1.969): Vox sang., 16, 486.
- SALVINIEN, J. y KAMINSKI, M., (1.955): Compt. Rend., 240, 377.
- SARICH, V.M. y WILSON, A.C., (1.966): Science N.Y., 154, 1.560.
- SARICH, V.M., (1.969): Syst. Zool., 18, 286.
- SCHEIDEGGER, J.J., (1.955): Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7, 103.
- SCHEIDEGGER, J.J., MARTIN, F. y RIOTTON, G., (1.956): J. suisse med., 86, 224.
- SCHEIFFARTH, F. y GOTZ, H., (1.957): Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 10, 82.
- SHAPIRO, A. L., VINUELA, E. y MAIZEL, J.V., (1.967): Biochem. Biophys. Res. Comms., 5, 815.
- SHIOIRI, K., (1.964): Jap. J. Exp. Med., 34, 245.
- SINGER, J.M., ORESKES, I. y ALTMANN, G., (1.962): J. Immunol., 89, 227.
- SMITH, G.L., (1.964): Trop. Geogr. Med., 16, 152.
- SMITHIES, O., (1.955): Biochem. J., 61, 629.



- SMITHIES, O., (1.959): Biochem. J., 71, 585.
- SMITHIES, O., (1.959): Adv. in Protein Chem., 14, 65.
- SOETARJO (1.964): Com. Vet. Spec. Iss., 8, 1.
- STAVITSKY, A.B., (1.954): J. Immunol., 72, 360.
- STRYER, L., (1.975): "Biochemistry". Freeman and co. ed. San Francisco.
- STURANI, G., D'ELIA, G. y AZZOLLINI, P., (1.976): Bullettino Chimici dei Laboratori Provinciali, 27, 241.
- SVEDBERG, T. y PEDERSEN, K.O., (1.940): "The ultracentrifuge". Clarendon Press. Oxford.
- SVET-MOLDAVSKY, G. y RAFFKINA, L.I., (1.963): Nature, 197, 52.
- SWIFT, K.F., WILSON, A.T. y LANCEFIELD, R.C., (1.943): J. Exptl. Med., 78, 123.
- TAMMEMAGI, L., (1.954): Queensland Agr. Sci., 11, 83.
- TAYLOR, J.E., (1.952): S. Afr. Med. J., 26, 81.
- TEFNERDY, R.P. y SMALL, W.N., (1.966): Nature, 210, 708.
- THOMPSON, R.R., (1.960): J. Ass. Offic. Agr. Chem., 43, 763.
- THOMPSON, R.R., (1.961): J. Ass. Offic. Agr. Chem., 44, 787.
- THOMPSON, G.B., DAVIDSON, W.D., MONTGOMERY, M.W. y ANGLER, A.F., (1.968): J. Food Sci., 33, 68.
- TOKUDA, G. y WARRINGTON, R.F., (1.970): Appl. Microbiol., 20, 35.
- TOMASI, T.B. y ZIGELBAUM, S.D., (1.963): J. Clin. Invest., 42, 1.552.
- TORMO, J. y CHORDI, A., (1.965): Nature, 205, 983.
- TORMO, J., (1.966): Tesis doctoral. Madrid.
- TORMO, J., CHORDI, A., RODRIGUEZ-BURGOS, A. y DIAZ, R., (1.967): Veterinary Record, 14, 392.

- TORMO, J. CHORDI, A. y GONZALEZ-CASTRO, J., (1.968): Rev. Iber. Parasitol., 28, 535.
- URIEL, J. y GRABAR, P., (1.956): Annls. Inst. Pasteur, 90, 427.
- URIEL, J., (1.958): Clin. Lab. (Zaragoza), 65, 87.
- URIEL, J., AURAMFAS, S. y GRABAR, P., (1.964): "Protides of the biological fluids". (H. Peeters ed.) Elsevier. Amsterdam.
- WARNECKE, M.O. y SAFFLE, R.L., (1.968): J. Food Sci., 33, 131.
- WASSERMAN, E. y LEVINE, D., (1.961): J. Immunol., 87, 290.
- WEBB, K.S., MICKY, D.D., STOVE, K.R. y PAHLSON, D.F., (1.977): J. Immunol. Methods, 14, 343.
- WEINSTOCK, A., (1.953): J. Milk and Food Technol., 16, 257.
- WEBER, K. y OSBORN, M., (1.963): J. Biol. Chem., 244, 4.406.
- WEITZ, B. y GLASGOW, J.P., (1.956): Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 50, 593.
- WHIPLE, H.E. (ed.) (1.964): Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 305.
- WIEMW, R.J., (1.959): Clin. Chim. Acta, 4, 317.
- WILLIAMS, C.A., (1.964): "Evolutionary and Genetic Biology of Primates". (J. Buettner ed.) Academic Press. New York.
- WOLBERG, G., LINZ, C.T. y ADLER, F.L., (1.969): J. Immunol., 103, 879.
- WOLBERG, G., LINZ, C.T. y ADLER, F.L., (1.970): J. Immunol., 105, 797.
- WUNDERLY, C., (1.961): Advan. Clin. Chem., 4, 207.
- YALOW, R.S., BERSON, S.A., (1.960): J. Clin. Invest., 39, 1.157.
- ZINSER, H., (1.930): J. Immunol., 18, 483.

